



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALTAIR ROGERIO AMBROSIO

NOVAS EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DAS FICOLINAS E COLECTINAS
NA INTERAÇÃO FRENTE A *Leishmania (Viannia) braziliensis* E *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum*.

CURITIBA-PR

2020

ALTAIR ROGERIO AMBROSIO

NOVAS EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DAS FICOLINAS E COLECTINAS
NA INTERAÇÃO FRENTE A *Leishmania (Viannia) braziliensis* E *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum*.

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação
em Medicina Interna e Ciências da Saúde,
Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná como requisito parcial a
obtenção do título de Doutor em Medicina
Interna e Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof. Dra. Iara José de Messias-
Reason

Coorientadora: Dra. Lorena Bavia

CURITIBA-PR

2020

A496 Ambrosio, Altair Rogerio

Novas evidências da participação das ficolinas e colectinas na interação frente a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* [recurso eletrônico] / Altair Rogerio Ambrosio.
– Curitiba, 2020.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Iara José de Messias-Reason

Coorientadora: Profa. Dra. Lorena Bavia

1. *Leishmania braziliensis*. 2. *Leishmania infantum*.
3. Colectinas. 4. Ficolinas. I. Messias-Reason, Iara José de.
II. Bavia, Lorena. III. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. VI. Título.

NLM: WC 715

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, BIBLIOTECÁRIA: RAQUEL PINHEIRO COSTA
JORDÃO CRB 9/991



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA INTERNA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE - 40001016012P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALTAIR ROGERIO AMBROSIO** intitulada: **Novas evidências da participação das ficolinas e colectinas na interação com a *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum***, sob orientação da Profa. Dra. IARA JOSE DE MESSIAS REASON, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 21 de Outubro de 2020.

Assinatura Eletrônica
21/10/2020 22:18:52.0

IARA JOSE DE MESSIAS REASON
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
23/10/2020 09:29:29.0

FABIANO BORGES FIGUEIREDO
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica
21/10/2020 19:57:09.0

MAGDA CLARA VIEIRA DA COSTA RIBEIRO
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA)

Assinatura Eletrônica
23/10/2020 09:16:43.0

MONIQUE PAIVA CAMPOS
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS/FIOCRUZ)

Assinatura Eletrônica
21/10/2020 18:22:09.0

ANGELICA BEATE WINTER BOLDT
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA/UFPR)

ERRATA:

Onde se lê: "NOVAS EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DAS FICOLINAS E COLECTINAS NA INTERAÇÃO COM A LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS E LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM."

Leia-se: "NOVAS EVIDÊNCIAS DA PARTICIPAÇÃO DAS FICOLINAS E COLECTINAS NA INTERAÇÃO FRENTE A LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS E LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM."

EMILTON LIMA JUNIOR
COORDENADOR DE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE - UFPR

Rua General Carneiro, 181 - Prédio Central - 11º Andar - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80060-150 - Tel: (41) 3360-1099 - E-mail: ppgmedicina@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 56637

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 56637

Ao Sr. Luciano e dona Selma (*in memoriam*), pela orientação nos primeiros passos; aos meus irmãos, pelo exemplo de perseverança; às amigas e professoras, Iara e Lorena, geradoras de todo estímulo; à minha família, Andrea, Isadora e João Eduardo pelo amor e aconchego.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Iara de Messias-Reason por sempre acreditar e incentivar na execução dos projetos.

À minha coorientadora Dra. Lorena Bavia pelo apoio, incentivo e ideias.

Ao Dr. Fabiano Borges Figueiredo pelos ensinamentos e disponibilização do Laboratório de Biologia Celular-ICC/FIOCRUZ para execução dos experimentos.

À Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro pelos ensinamentos e disponibilização do Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR para execução dos experimentos.

À Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ e a Priscila Mazzocchi Hiraiwa, pela viabilização e auxílio nas análises de citometria de fluxo.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência CTAF-UFPR e a Israel Henrique Bini pela viabilização e auxílio nas análises de microscopia confocal.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia Molecular-UFPR, Laboratório de Biologia Celular-FIOCRUZ e Laboratório de Parasitologia Molecular-UFPR pelo apoio e descontração.

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, relacionada com a pobreza e transmitida por flebotomíneos, apresenta duas principais formas clínicas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT)/Cutânea (LC). Estima-se uma incidência de 0,7 a 1 milhão de casos novos de leishmaniose descritos anualmente em aproximadamente 100 países endêmicos. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. braziliensis*), é um dos causadores da LC e o principal causador da leishmaniose mucocutânea (LMC), enquanto a *Leishmania (Leishmania) infantum* (*L. infantum*) é o agente causador da LV no Brasil. O sistema complemento compreende um conjunto de mais de 50 proteínas plasmáticas ou associadas às membranas com importante papel na resposta imune contra patógenos. A ativação do complemento gera mecanismos efetores chaves na resposta inata que inclui, opsonização de patógenos e complexos imunes, recrutamento de leucócitos e reações inflamatórias, além da lise celular. Existem três vias de ativação do complemento: clássica, alternativa e das lectinas. A via clássica é iniciada principalmente na presença de complexo antígeno anticorpo. A via alternativa tem seu início após a hidrólise espontânea do componente C3. A via das lectinas é ativada preferencialmente pelo reconhecimento de polissacarídeos presentes na superfície de microrganismos pelos componentes solúveis desta via, tais como a MBL, CL-11, CL-10 e ficolinas-1,-2,-3. Foi demonstrado que o complemento desempenha um papel crítico nos estágios iniciais da infecção por leishmanias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ligação das proteínas iniciadoras da via das lectinas MBL, CL-11 e ficolinas-1,-2,-3 na superfície da *L. braziliensis* e da *L. infantum*. Formas promastigotas vivas na fase estacionária de crescimento foram incubadas com soro humano normal ou MBL, CL-11 e ficolinas-1,-2,-3 recombinantes e a ligação foi avaliada por microscopia confocal e citometria de fluxo. Foi observado que MBL, CL-11 e ficolinas-1,-2,-3 se ligam a *L. braziliensis* (ficolina-1>ficolina-3>ficolina-2>CL-11>MBL). Ensaio de inibição revelaram que a manana é capaz de inibir completamente a ligação da MBL por microscopia confocal e que N-acetil-D-glucosamina diminui a intensidade de fluorescência na superfície das promastigotas da *L. braziliensis* em aproximadamente 20% por citometria de fluxo. Já com a *L. infantum* observou-se que MBL, CL-11, ficolina-1 e ficolina-3 interagem, porém, a ficolina-2 não. A afinidade de ligação das proteínas ao parasito demonstrou, MBL>ficolina-1>ficolina-3>CL-11. A interação do soro humano com a *L. infantum* levou a deposição dos fragmentos do complemento C3b e C4b na sua superfície, caracterizando ativação da via das lectinas. Nossos resultados demonstraram que as proteínas ativadoras da via das lectinas (MBL, CL-11 e ficolina-1,-2,-3), interagem distintamente com a *L. braziliensis* e *L. infantum* e indicam sua participação nas etapas iniciais da infecção. MBL, CL-11 e ficolinas-1,-2,-3 podem ser potenciais candidatas a modificadores da resposta imune inata na LC e LV e úteis na estratégia de desenhos de novas imunoterapias.

Palavras-chave: *L. braziliensis*; *L. infantum*; MBL; CL-11; Ficolinas.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease, related to poverty and transmitted by sandflies, has two main clinical forms: Visceral Leishmaniasis (VL) and Cutaneous Leishmaniasis (CL). It is estimated an incidence of 0.7 to 1 million new cases of leishmaniasis described annually in around 100 endemic countries. *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. braziliensis*), is agent of CL and the main agent of mucocutaneous leishmaniasis (MCL), while *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (*L. infantum*) is the causative agent of VL in Brazil. The complement system comprises more than 50 plasma or membrane-associated proteins with an important role in the immune response against pathogens. Complement activation generates key effector mechanisms in the innate response that includes, opsonization of pathogens and immune complexes, recruitment of leukocytes and inflammatory reactions, in addition to cell lysis. The complement system is activated by three pathways: classical, alternative and lectins. The classical pathway is initiated mainly by the presence of antigen antibody complex. The alternative pathway is activated by spontaneous hydrolysis of C3. The lectin pathway is preferably activated by the recognition of polysaccharides present on the surface of microorganisms by the soluble components of this pathway, such as MBL, CL-11, CL-10 and ficolins-1, -2, -3. Complement has been shown to play a critical role in the early stages of *Leishmania* infection. The objective of this study was to evaluate the binding of the lectin pathway activators MBL, CL-11 and ficolins-1, -2, -3 on the surface of *L. braziliensis* and *L. infantum*. Live promastigotes forms in the stationary growth phase were incubated with normal human serum or MBL, CL-11 and ficolins-1, -2, -3 recombinants and the binding was evaluated by confocal microscopy and flow cytometry. It was observed that MBL, CL-11 and ficolins-1, -2, -3 bind to *L. braziliensis* (ficolina-1> ficolina-3> ficolina-2> CL-11> MBL). Inhibition assays revealed that mannan is able to completely inhibit MBL binding by confocal microscopy and N-acetyl-D-glucosamine decreases the fluorescence intensity on the surface of *L. braziliensis* promastigotes in around 20% by flow cytometry. With *L. infantum*, it was observed that MBL, CL-11, ficolin-1 and ficolin-3 interact, however, ficolin-2 does not. The protein-binding affinity for the parasite demonstrated MBL> ficolin-1> ficolin-3> CL-11. The interaction of human serum with *L. infantum* led to the deposition of fragments of complement C3b and C4b on its surface, characterizing the lectin pathway activation. Our results demonstrated that the activators proteins of the lectin pathway (MBL, CL-11 and ficolin-1, -2, -3), interact distinctly with *L. braziliensis* and *L. infantum* and indicate their participation in the initial steps of infection. MBL, CL-11 and ficolins-1, -2, -3 could be potential candidates for innate immune response modifiers in CL and VL and useful in the strategy of designing new immunotherapies.

Keywords: *L. braziliensis*; *L. infantum*; MBL; CL-11; Ficolins.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO BIOLÓGICO DE <i>Leishmania</i>	21
FIGURA 2 - FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>Leishmania</i>	22
FIGURA 3 - FORMA PROMASTIGOTA DE <i>Leishmania</i>	22
FIGURA 4 - CICLO BIOLÓGICO E METACICLOGENESE DE <i>Leishmania</i>	24
FIGURA 5 - TIPOS DE MOLÉCULAS DE <i>Leishmania</i> CONTENDO DOMÍNIOS LPG.....	24
FIGURA 6 - ESTRUTURA DA LPG.....	25
FIGURA 7 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DOS DIFERENTES TIPOS DE LPG	26
FIGURA 8 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DO LPG DA <i>L. braziliensis</i> NA FORMA PROCÍCLICA E METACÍCLICA.....	27
FIGURA 9 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS DIFERENTES TIPOS DE GLICOINOSITOLFOLOSFOLÍPIDES (GIPLS)	29
FIGURA 10 – FÊMEA DE <i>Lutzomyia</i> spp. TRANSMISSOR DE <i>Leishmania</i> spp.....	31
FIGURA 11 - LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA.....	32
FIGURA 12 - CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR POR MUNICÍPIO NO BRASIL	33
FIGURA 13 - CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL	34
FIGURA 14 - LEISHMANIOSE CUTÂNEA PÓS KALAZAR.....	36
FIGURA 15 - CASOS DE LV POR UNIDADE DA FEDERAÇÃO BRASILEIRA	37
FIGURA 16 - CASOS CONFIRMADOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL BRASIL	37
FIGURA 17 - FUNÇÕES DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	41
FIGURA 18 - VISÃO GERAL DO SISTEMA DE COMPLEMENTO.....	42

FIGURA 19 - ESTRUTURA MOLECULAR DA MBL, CL-11 E FICOLINAS-1, -2 E -3.....	44
FIGURA 20 – FLUXOGRAMA DA ADESÃO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A <i>L. braziliensis</i>	52
FIGURA 21 – FLUXOGRAMA DA QUANTIFICAÇÃO DA ADESÃO DAS PROTEÍNAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS

C	Proteína do complemento
CL-11	Colectina 11
CR	Receptor de membrana do complemento
CRD	Domínio de reconhecimento do carboidrato
CRP	Proteína C reativa
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
EthN	Fosfoetanolamina
Fc	Região constante das imunoglobulinas
GIPL	Fosfolipio de glicosilinositol
Glc-NAc	N-Acetilglucosamina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
<i>L. braziliensis</i>	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicana
LPS	Lipopolissacarídeo
LC	Leishmaniose cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
MAC	Complexo de ataque a membrana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogênio
MASP	Serino protease associada a MBL
MBL	Lectina ligante da manose
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NETs	Armadilhas de neutrófilos extracelulares
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos

PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PG	fosfoglicana extracelular
PPG	Proteofosfoglicano
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
sAP	Fosfoglicano secretada
TBS	Solução salina tamponada com tris
TGF	Fator de crescimento tumoral
TNF	Fator de necrose tumoral
Th	Linfócito T auxiliar CD4+ (<i>helper</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA.....	18
1.2 HIPÓTESES.....	18
1.3 OBJETIVOS	19
1.3.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 LEISHMANIAS	20
2.1.1 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO	20
2.1.2 MORFOLOGIA DA <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	20
2.1.3 GLICOCONJUGADOS NA INFECTIVIDADE DA <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i>	22
2.1.4 LEISHMANIOSES	31
2.1.4.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	31
2.1.4.1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR	32
2.1.4.1.2 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	34
2.1.4.2 LEISHMANIOSE VISCERAL	35
2.1.4.2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	36
2.1.4.2.2 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL	38
2.1.5 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES.....	38
2.1.6 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	39
2.2 SISTEMA COMPLEMENTO	39
2.2.1 VIA DAS LECTINAS	42
2.2.2 LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL)	44
2.2.3 COLECTINA-11 (CL-K1, CL-11)	45
2.2.4 FICOLINAS (Ficolina-1/M, Ficolina-2/L e Ficolina-3/H).....	46
2.3 LEISHMANIAS & SISTEMA COMPLEMENTO	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 PARASITOS.....	50
3.2 ENSAIOS DO COMPLEMENTO	50
3.2.1 FONTE DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS HUMANAS	50

3.2.2 INATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NO SHN	50
3.2.3 ADSORÇÃO DO SHN	50
3.2.4 ENSAIO DE ADESÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A PROMASTIGOTAS DA <i>L. braziliensis</i> POR MICROSCOPIA CONFOCAL	51
3.2.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES A <i>L. braziliensis</i> POR CARBOIDRATOS	52
3.2.6 ENSAIO DE ADESÃO E QUANTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A PROMASTIGOTAS DA <i>L. braziliensis</i> E <i>L. infantum</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	53
3.2.7 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE PROTEÍNAS SÉRICAS A <i>L.</i> <i>braziliensis</i> POR CARBOIDRATO	54
3.2.8 ENSAIO DE ADESÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A PROMASTIGOTAS DA <i>L. infantum</i> POR MICROSCOPIA CONFOCAL	55
3.2.9 DEPOSIÇÃO DE C4 E C3 NA SUPERFÍCIE DA <i>L. infantum</i> POR CITOMETRIA DE FLUXO	55
3.2.10 ENSAIO LÍTICO POR COMPLEMENTO	56
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
4 RESULTADOS	57
4.1 ARTIGO 1 (Publicado no periódico <i>Acta tropica</i>)	57
4.2 ARTIGO 2 (Submetido ao periódico <i>Parasite</i>)	61
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
6 CONCLUSÕES	76
7 DEMAIS PRODUÇÕES	77
7.1 ARTIGO 3 (REVISÃO COM PRIMEIRA AUTORIA COMPARTILHADA) ...	77
7.2 ARTIGO 4 (COAUTOR AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA LABORATORIAL) .	78
7.3 ARTIGO 5 (COAUTOR EXTRAÇÃO DE DNA MICROBIANO DO SANGUE PERIFÉRICO)	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, relacionada com a pobreza e que apresenta duas principais formas clínicas: Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar (LT) ou cutânea (LC). Estima-se uma incidência de 0,7 a 1 milhão de casos de leishmaniose descritos anualmente, em aproximadamente 100 países endêmicos (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é um dos agentes causadores da LC e o principal da leishmaniose mucocutânea (LMC). Já a *Leishmania (Leishmania) infantum* é o agente causador da LV no Brasil. Estas doenças são endêmicas em vários países da América do Sul e representam um grave problema de saúde pública para o Brasil (AMEEN, 2010). Os agentes causadores são transmitidos através da picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos (Ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae) dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*, os quais regurgitam no hospedeiro formas promastigotas do parasito. As leishmanias possuem um ciclo vital digenético alternando entre o estágio promastigota que é a forma flagelada presente no intestino do flebotomíneo transmissor e, a amastigota, encontrada no interior dos macrófagos e outras células fagocíticas em vertebrados hospedeiros (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A fagocitose é o passo inicial necessário para ocorrer a infecção pelas leishmanias, que resulta na invasão de células mononucleares, processo mediado pela ligação de receptores celulares de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*), incluindo lectina ligadora da manose (MBL), colectina-11 (CL-11) e ficolinas-1, -2, -3 presentes nas células do hospedeiro. Os PRRs se ligam as estruturas da parede celular das promastigotas, genericamente denominadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular pattern*). Além disso, proteínas do sistema complemento, como C3b, são depositadas sobre a superfície do patógeno durante a resposta imune do hospedeiro, opsonizando-o, e, dessa forma, contribuindo também para a sua fagocitose por meio de receptores específicos tais como receptor do complemento (CR) 1 e CR3 (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

O sistema complemento desempenha importante papel na defesa contra microrganismos invasores por participar tanto de mecanismos da imunidade

inata como adaptativa. Este compreende um conjunto de mais de 50 proteínas plasmáticas ou associadas às membranas. Como consequência da ativação do complemento, os seguintes mecanismos efetores ocorrem: opsonização de patógenos e complexos imunes, recrutamento de leucócitos e reações inflamatórias, além da lise celular. Existem três vias de ativação do complemento: clássica, alternativa e das lectinas. A via clássica é iniciada principalmente na presença de complexo antígeno anticorpo, seguida pela ativação do componente C1. A via alternativa tem seu início após a hidrólise espontânea do componente C3, promovida principalmente por estruturas presentes nos patógenos. A via das lectinas é ativada preferencialmente pelo reconhecimento de polissacarídeos presentes na superfície de microrganismos pelos componentes solúveis desta via, tais como as colectinas MBL, colectina 10, CL-11 (CL-K1) e ficolinas [ficolina-1(M), -2(L), -3(H)] (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014).

Estudos revelaram que nos primeiros instantes do processo de invasão, a *L. braziliensis* e *L. infantum* entram em contato com componentes do sistema complemento, ocorre deposição de MBL e outras proteínas do complemento (C4b, C3b, C1q) na superfície das formas promastigotas (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005; SANTOS; COSTA; KRIEGER; FEITOSA *et al.*, 2001). Porém, ainda não se conhece o comportamento das demais proteínas da via das lectinas (CL-11 e ficolinas-1, -2, -3), fazendo-se necessário a elucidação destes mecanismos para melhor entendimento da patogênese da doença.

Diante da diversidade biológica presente nos vários grupos de patógenos, é iminente a necessidade de estudos específicos com esta finalidade. Considerando a falta de informação sobre como as proteínas envolvidas na via das lectinas interagem com a *L. braziliensis* e *L. infantum*, é necessário explorar abordagens para se compreender esse mecanismo e, consequentemente, seu papel na patogênese da leishmaniose. O objetivo central deste trabalho foi demonstrar a interação das proteínas iniciadoras da via das lectinas (MBL, CL-11 e ficolinas-1,-2,-3) com a *L. braziliensis* e *L. infantum* com o intuito de caracterizar os passos iniciais no processo da infecção por tais parasitos.

1.1 JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA:

Considerando que as leishmanioses visceral e tegumentar são doenças negligenciadas e um grande problema de saúde pública para o Brasil. Além disso, o complemento demonstrou desempenhar um papel crítico nas fases iniciais da infecção por leishmanias. Quando as promastigotas são regurgitadas em mamíferos, eles são expostos ao complemento, que pode levar à lise ou fagocitose dos parasitos. Nesse estágio, o parasito pode estar coberto por fragmentos do complemento, como C3b e C3bi, que medeiam a fagocitose pelos receptores do complemento CR1 ou CR3 nos macrófagos. Assim, a ativação do complemento e os receptores do complemento são dispositivos importantes usados pelas promastigotas para invadir células fagocíticas. Na verdade, estudos mostraram que leishmanias não se ligam aos macrófagos na ausência de complemento. Nesse contexto, os PRMs que levam à ativação do complemento, podem ser importantes para determinar o destino da infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum* durante a resposta inicial ao parasito. Poucos estudos relataram a interação das proteínas da via das lectinas com leishmanias e, até o momento, apenas a ligação da MBL a *L. braziliensis* e *L. infantum* foi descrita. Neste estudo, mostramos pela primeira vez que ficolinas e CL-11 também reconhecem PAMPs na superfície de promastigotas vivos da *L. braziliensis* e *L. infantum*. Considerando que ficolinas, CL-11 e MBL têm um papel central na ativação da via das lectinas, nossos resultados destacam a importância das proteínas da via das lectinas do complemento na resposta inata à infecção por leishmanias.

1.2 HIPÓTESES

Com base nos conhecimentos já estabelecidos sobre a participação do sistema complemento na resposta imune inata nas leishmanioses visceral e tegumentar, formulamos as seguintes hipóteses a serem testadas neste trabalho.

- I. As proteínas de reconhecimento de patógenos MBL, CL-11 e as ficolinas-1, -2, -3 podem reconhecer e se ligar à superfície de formas promastigotas da *L. braziliensis* e *L. infantum*.

- II. MBL, CL-11, e ficolinas-1, -2, -3 apresentam diferentes padrões e afinidades de ligação a superfície de formas promastigotas da *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- III. A *L. infantum* pode ativar o complemento pela via das lectinas.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GERAL: Avaliar o grau de interação entre as proteínas iniciadoras da via das lectinas e a superfície de cepas de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar e avaliar a capacidade das proteínas séricas e recombinantes MBL, CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 de reconhecerem e se ligarem a superfície celular da *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- b) Comparar a intensidade e afinidade de ligação das proteínas séricas e recombinantes MBL, CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 nas formas promastigotas metacíclicas da *L. braziliensis* e *L. infantum*.
- c) Avaliar a capacidade do polissacarídeo manana e dos monossacarídeos D-galactose e N-Acetil-D-Glucosamina em inibir a ligação das proteínas recombinantes MBL, CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 a *L. braziliensis* por microscopia confocal.
- d) Avaliar a capacidade do monossacarídeo N-acetil-D- glucosamina na inibição da ligação da CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 séricas a *L. braziliensis* por citometria de fluxo.
- e) Demonstrar a deposição de produtos da clivagem de C3 e C4 na superfície da *L. infantum* após interação com soro humano normal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIAS

2.1.1 CICLO BIOLÓGICO E TRANSMISSÃO

O ciclo de vida da *Leishmania* ocorre nos hospedeiros invertebrados e nos vertebrados. O ciclo tem início com a picada das fêmeas de flebotomíneos, que para a LV pode ser em qualquer região do corpo do hospedeiro vertebrado infectado, porém, para a LC esta deve ocorrer na região da lesão cutânea. Quatro a cinco dias após o repasto sanguíneo realizado em um hospedeiro vertebrado infectado, as formas amastigotas ingeridas se transformam em promastigotas, multiplicam-se por fissão binária e migram para a parte anterior do tubo digestivo do flebotomíneo, atingindo o aparelho picador sugador. Ao picar outro animal ou ser humano, ocorre a regurgitação das formas promastigotas, que são englobadas por macrófagos/neutrófilos do hospedeiro vertebrado. Nas células fagocitárias dos vertebrados, os parasitos se transformam em formas amastigotas, que se dividem dentro dos vacúolos parasitóforos. A célula infectada multiplica-se, dividindo seus parasitos entre as células filhas, ou se rompe liberando as amastigotas que são, então, fagocitadas por outros macrófagos e tornam a se multiplicar. Em outros repastos sanguíneos, novos flebotomíneos ingerem células fagocíticas infectadas. No tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se por fissão binária e o ciclo recomeça (Fig. 01)(BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

2.1.2 MORFOLOGIA DA *L. braziliensis* E *L. infantum*

L. braziliensis e *L. infantum* são protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida da família Trypanosomatidae. Estes parasitos possuem duas formas principais: amastigota e promastigota. A forma com flagelo curto (não visível ao microscópio óptico) denominada de amastigota (Fig. 02), é observada “*in vivo*”, em tecidos humanos e de animais vertebrados, dentro e fora de células fagocíticas; e em cultivo a 37°C “*in vitro*”. Estas formas são arredondadas ou ovóides, e medem de 3-6 µm de comprimento por 2-4 µm de largura conforme a espécie. A forma flagelada, denominada promastigota, se alterna entre as

formas: próclica, nectomonas, leptomonas, haptomonas e metacíclica que é a forma infectante (SUNTER; GULL, 2017)(Fig. 03). Esta se encontra presente no tubo digestivo de flebotomíneos e nos meios de cultura a 25°C. Apresentam-se alongadas, com 10-15 µm de comprimento por 2-3,5 µm de largura, possuem cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre, geralmente mais longo que o corpo, o qual tem origem na extremidade anterior do parasito, que é mais larga do que a extremidade posterior (RANGEL; LAINSON, 2009).

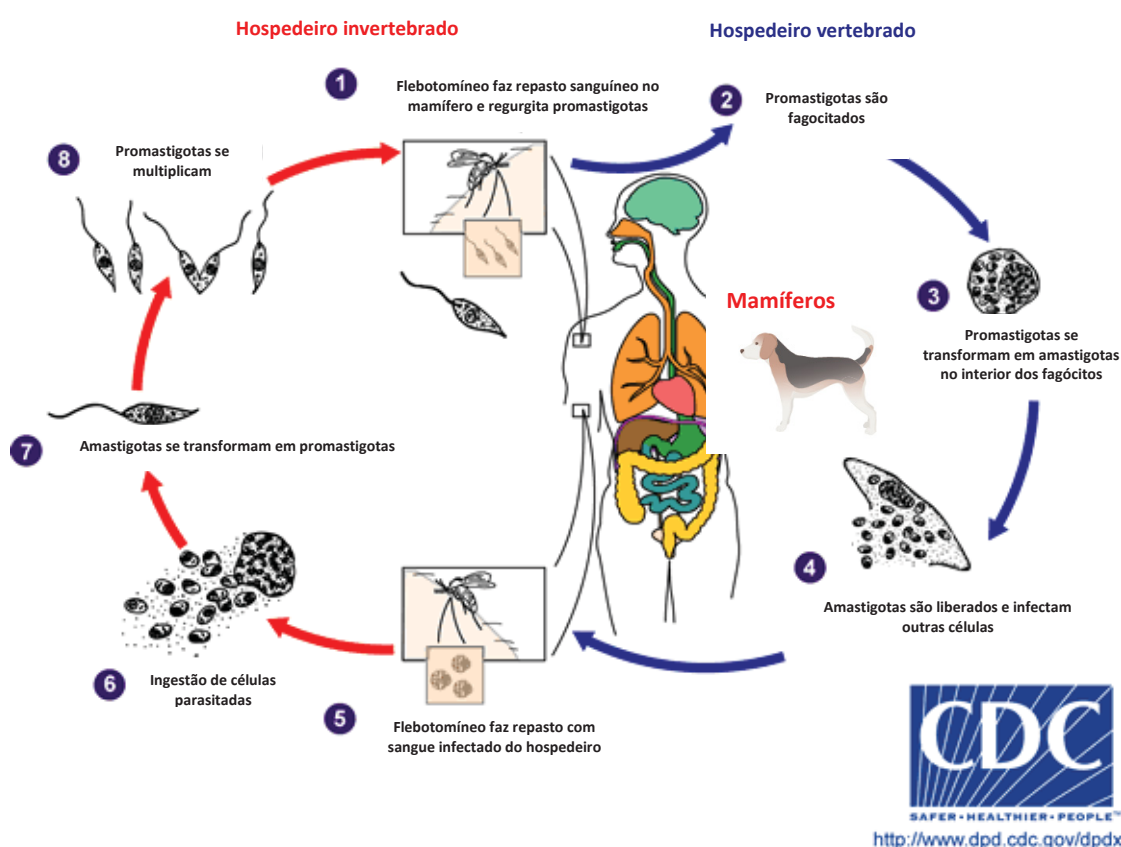


Fig. 01 Ciclo biológico da *L. donovani* modificado para *L. infantum*. (1) Flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo e injeta promastigotas. (2) Promastigotas são fagocitados. (3) Promastigotas se transformam em amastigotas no interior das células fagocitárias. (4) Amastigotas são liberados e infectam outras células. (5) Flebotomíneo ingere sangue infectado do hospedeiro. (6) Ingestão de células parasitadas. (7) Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do flebotomíneo. (8) Promastigotas se multiplicam no intestino do flebotomíneo.

Fonte: modificado de <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> (2019)

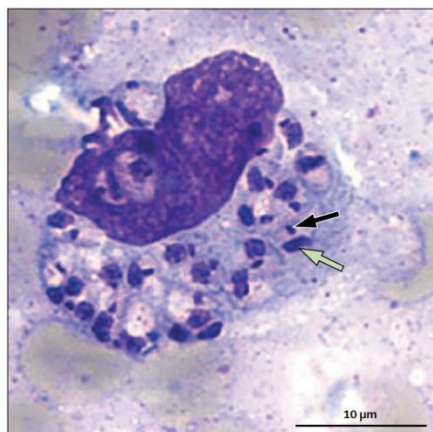


Fig. 02 Formas amastigotas de *Leishmania spp.* no interior de macrófagos. Seta preta indica o cinetoplasto, seta branca o núcleo. Fonte: (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018)

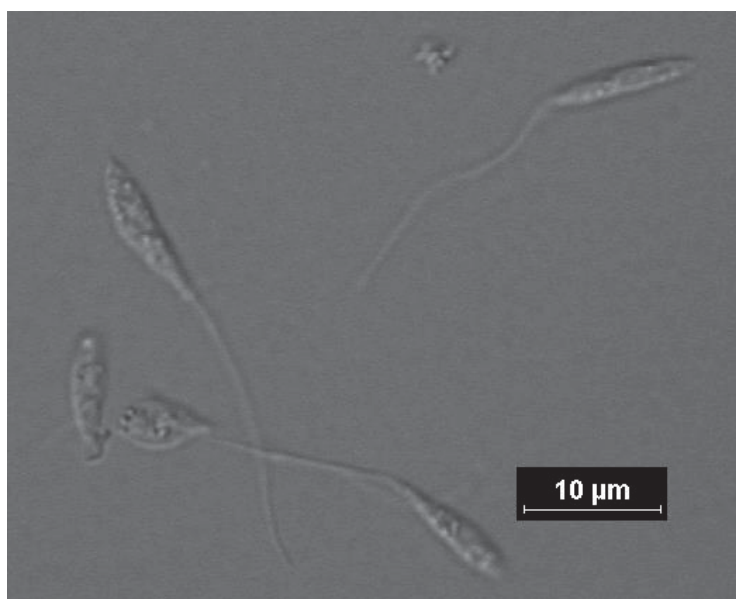


Fig. 03 Forma flagelada (promastigota) de *Leishmania spp.* em cultura. Fonte: autor (2019).

2.1.3 GLICOCONJUGADOS NA INFECTIVIDADE DA *L. braziliensis* e *L. infantum*

Durante seu ciclo de vida, as leishmanias alternam entre dois estágios distintos de desenvolvimento. No hospedeiro vertebrado, o parasito sob a forma amastigota (não móvel), prolifera dentro dos fagolisossomos (ricos em ácidos e hidrolases) das células fagocitárias. Ao se alimentar, o vetor ingere células contendo as formas amastigotas, que durante o processo de digestão

diferenciam-se para a forma promastigota, a qual se ligará ao epitélio do intestino médio pelo flagelo, para evitar ser excretada durante a digestão (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). A virulência é adquirida durante a metaciclogênese, que é um processo pelo qual as formas promastigotas divisíveis não-infecciosas (procíclicas), alternam entre as formas, nectomonas, leptomonas, haptomonas e se transformam em uma forma infecciosa e não divisível (metacíclica). As promastigotas metacíclicas se desprendem das células epiteliais do intestino e migram para a extremidade anterior do aparelho digestivo. No próximo repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no hospedeiro mamífero, onde devem escapar e resistir aos mecanismos de defesa não específicos, como a lise pelo complemento, para finalmente se ligar e entrar em fagócitos mononucleares através de receptores para fragmentos do complemento (C3b e C3bi). Uma vez dentro de um vacúolo ou fagossomo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas evitam a degradação e estabelecem condições favoráveis à sua proliferação. O aumento da temperatura e a diminuição do pH fagossômico fornecem os sinais necessários para a diferenciação de promastigota para amastigota. Por fim, os macrófagos infectados se rompem, liberando as amastigotas para o ambiente circundante, onde podem infectar os macrófagos vizinhos (Fig. 04) (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

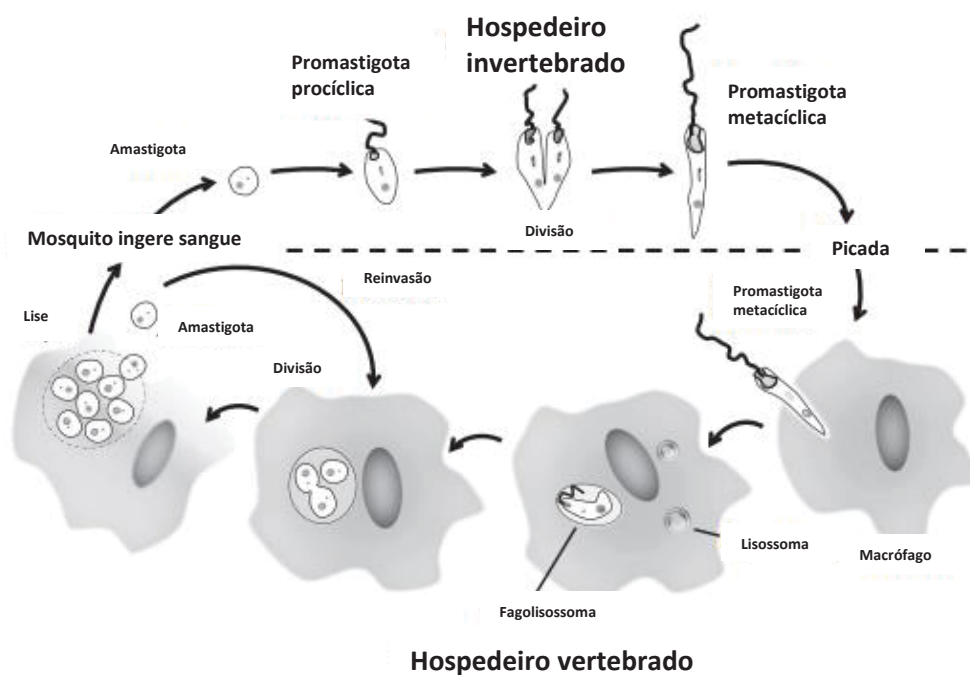


Fig. 04 Ciclo biológico e metaciclo genese de *Leishmania*. Fonte: modificada de (ASSIS; IBRAIM; NORONHA; TURCO *et al.*, 2012).

Para entender o significado crítico dos glicoconjugados na biologia das leishmanias, é importante investigar como o parasito é capaz de sobreviver aos adversos ambientes em seu ciclo de vida. O parasito deve evitar a destruição pelas enzimas digestivas no intestino do vetor, pelo complemento na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, e, por fim, pelas enzimas hidrolíticas, pH ácido e espécies reativas de oxigênio presentes nos fagolisossomos dos macrófagos. A elucidação dos processos moleculares relacionados a sobrevivência das leishmanias em ambiente hostil envolve uma compreensão da estrutura, biossíntese e função dos seus glicoconjugados, ao longo de sua existência (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

O principal glicoconjugado de superfície de promastigotas de leishmanias é o lipofosfoglicano (LPG). A estrutura do LPG de diversas espécies de leishmanias passa por várias modificações importantes durante o ciclo de vida do parasito e são características de cada espécie. Além do LPG existem outras diferentes estruturas na superfície das leishmanias, tais como: fosfatidilinositol (PI), fosfolipídios de glicosilinositol (GIPL), fosfoglicano extracelular (PG), fosfoglicano secretado (sAP), proteofosfoglicano (PPG), fosfoetanolamina (EthN) (Fig. 05) (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

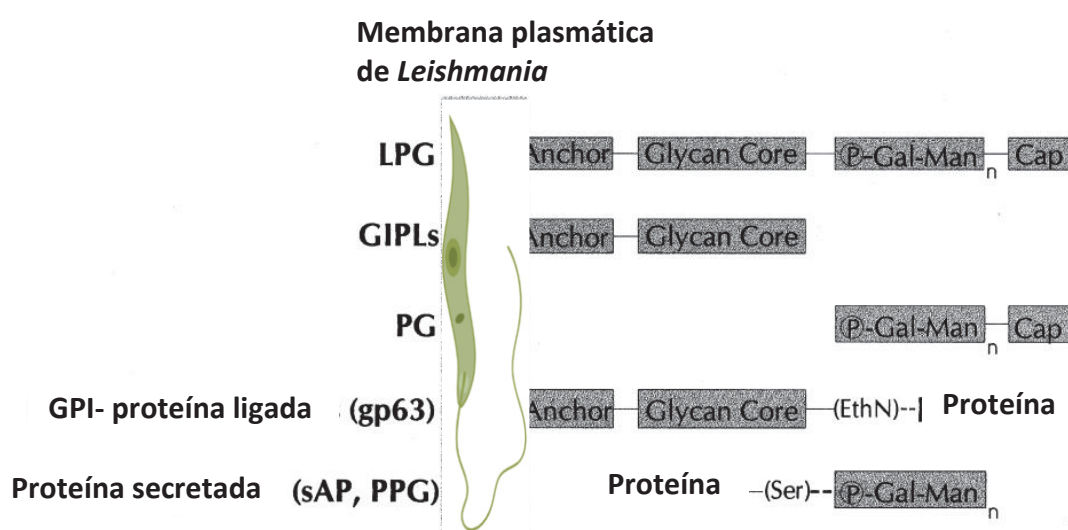


Fig. 05 Tipos de moléculas de *Leishmania spp.* contendo domínios LPG. Fosfatidilinositol (PI), fosfolipídios de glicosilinositol (GIPL), fosfoglicano

extracelular (PG), fosfoglicano secretado (sAP), proteofosfoglicano (PPG), fosfoetanolamina (EthN) Fonte: modificada de (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

O glicoconjugado de superfície mais estudado é o LPG, que forma um glicocálce denso cobrindo toda a superfície do parasito e o flagelo (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). O LPG é expresso predominantemente em promastigotas e está ausente em formas amastigotas intracelulares. O LPG foi bioquimicamente caracterizado e polimorfismos em sua estrutura são críticos para a especificidade das leishmanias por diferentes vetores. O reconhecimento de locais de ligação no epitélio do intestino do vetor pelo LPG é um passo crucial que impede a perda do parasito durante a excreção do sangue digerido. Durante o processo de diferenciação na metaciclogênese, o LPG passa por mudanças cruciais na estrutura, permitindo que o parasito se desconecte do epitélio intestinal e migre para o aparelho picador sugador (ASSIS; IBRAIM; NORONHA; TURCO *et al.*, 2012).

Nas leishmanias, a estrutura básica do LPG consiste em quatro domínios (Fig. 06), esta estrutura e o número de unidades de repetição de fosfoglicanos varia e depende do estágio de diferenciação e das espécies de leishmanias (ASSIS; IBRAIM; NORONHA; TURCO *et al.*, 2012). Vale ressaltar que o LPG é uma molécula complexa que apresenta polimorfismo inter e intraespécie, conforme ilustrado na Fig. 07 e Fig. 08 (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

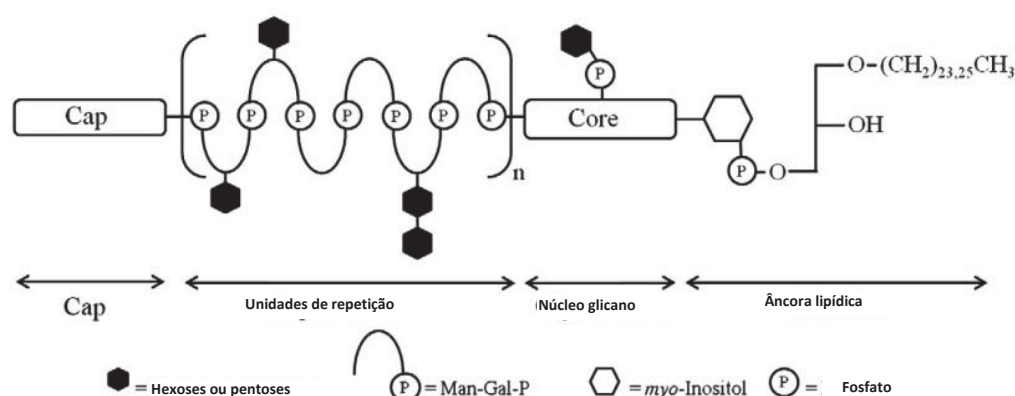


Fig. 06 Estrutura do LPG. O LPG possui quatro domínios: a âncora lipídica de liso-álquilglicerol ligada ao fosfatidilinositol, o núcleo glicano conservado (*core*),

as unidades de repetição e a *cap*. A estrutura e o número de unidades de repetição de fosfoglicanos variam e dependem do estágio de diferenciação e das espécies de leishmanias. Gal galactose; Man manose. Fonte: modificada de (ASSIS; IBRAIM; NORONHA; TURCO et al., 2012).

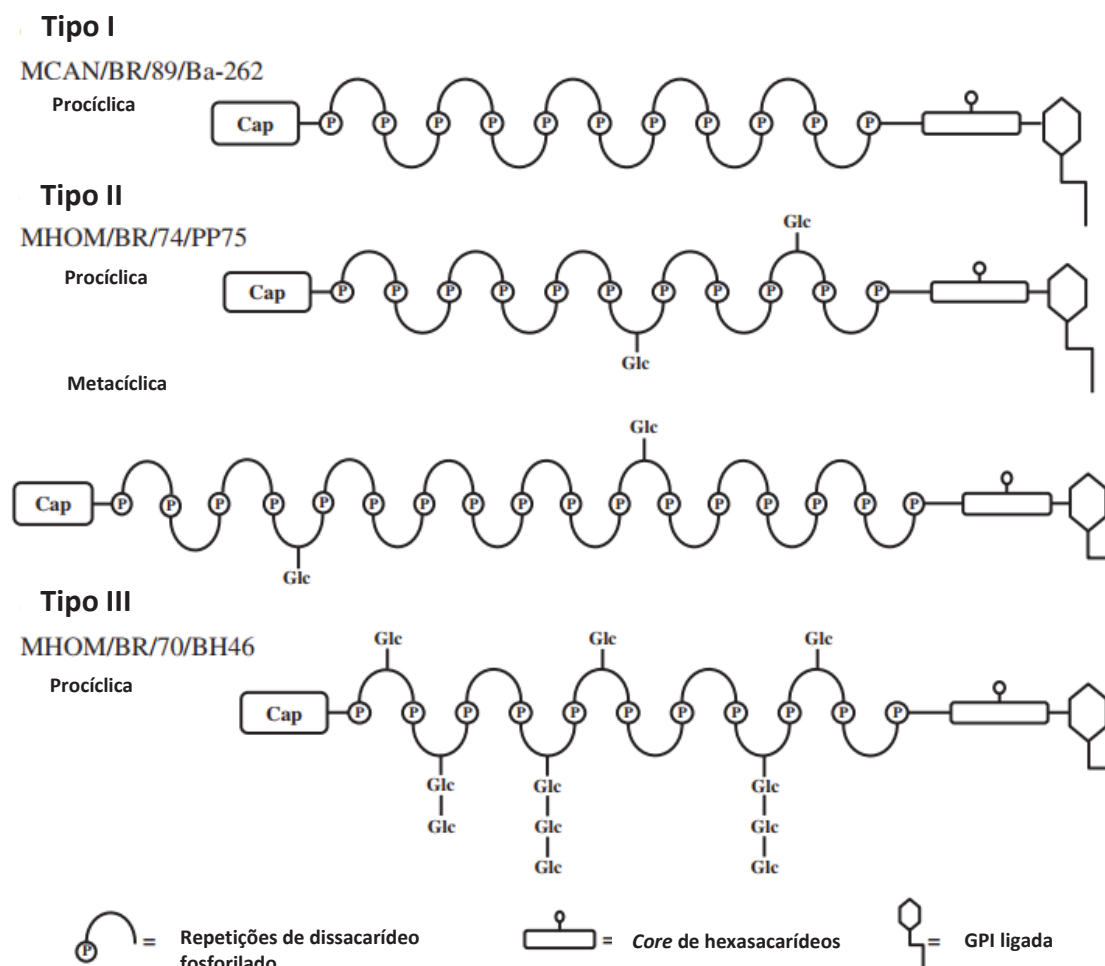


Fig. 07 Diagrama esquemático dos diferentes tipos de LPG (I, II e III) de diferentes cepas da *L. infantum*. Glc = glicose. Fonte: modificada de (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES et al., 2012)

Leishmania braziliensis
MHOM/BR/75/M2903

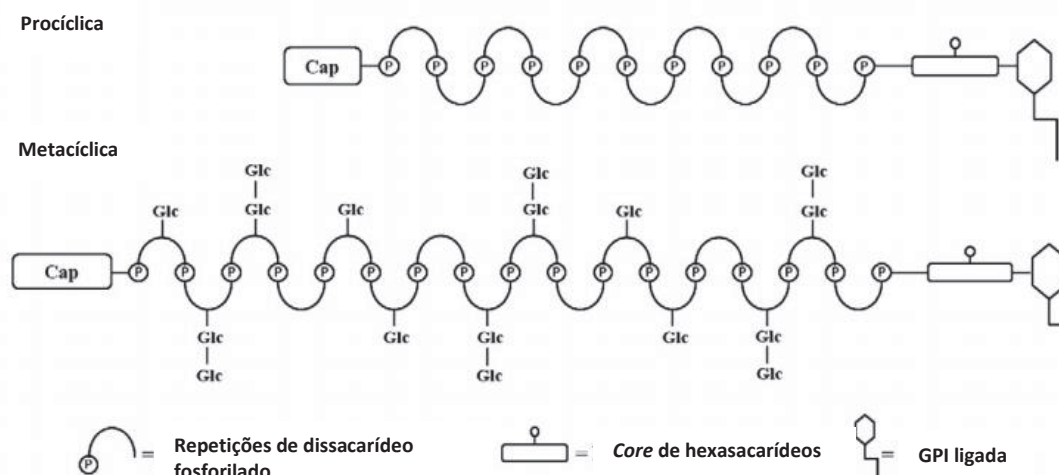


Fig. 08 Diagrama esquemático do LPG de *L. braziliensis* na forma procíclica e metacíclica. Glc = glicose. Fonte: modificada de (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

Foi postulado que na interação das leishmanias com espécies de flebotomíneos, polimorfismos inter e talvez intraespecíficos nos domínios fosfoglicanos da LPG podem ser cruciais para a especificidade de um determinado vetor (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

As leishmanioses compreendem um amplo espectro de manifestações clínicas, dependendo das espécies envolvidas. O LPG é crucial não apenas para a interação com o hospedeiro invertebrado, mas também para as etapas iniciais, durante o estabelecimento da infecção. No entanto, não se sabe o quanto variações na extensão dos glicoconjugados de superfície podem conduzir à polarização das respostas T auxiliares Th1 / Th2 [linfócitos T CD4+ auxiliar (*helper*)] e determinar o desfecho clínico da doença (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

Em geral, tem-se relatado que o LPG participa de uma variedade de processos durante o estabelecimento da infecção no hospedeiro vertebrado. Esses processos incluem: resistência à ação lítica do sistema complemento, fixação e entrada em macrófagos, proteção contra o dano proteolítico em vacúolos ácidos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999), inibição da maturação fagossômica (DERMINE; SCIANIMANICO; PRIVÉ; DESCOTEAUX *et al.*, 2000), modulação do óxido nítrico (NO) e produção de IL-12 (BRITTINGHAM;

MOSSER, 1996; PIEDRAFITA; PROUDFOOT; NIKOLAEV; XU *et al.*, 1999; PROUDFOOT; NIKOLAEV; FENG; WEI *et al.*, 1996), inibição da proteína cinase C (GIORGIONE; TURCO; EPAND, 1996), indução de armadilhas de neutrófilos extracelulares (NETs) (GUIMARÃES-COSTA; NASCIMENTO; FROMENT; SOARES *et al.*, 2009) e indução da proteína cinase R (PEREIRA; TEIXEIRA; BARRETO-DE-SOUZA; CALEGARI-SILVA *et al.*, 2010).

Após a inoculação pelo vetor das formas promastigotas de leishmanias na pele do hospedeiro, vários eventos moleculares ocorrem no local da picada. Os componentes celulares do sistema imunológico inato são determinantes durante as etapas iniciais da infecção, não apenas das leishmanias, mas também de outros protozoários. Células dendríticas, natural killer (NK), neutrófilos e macrófagos são alguns dos elementos-chave, atraídos em resposta ao parasito. A ativação dessas células é essencial para o desenvolvimento e polarização dos linfócitos para um perfil de resposta Th1 e o estabelecimento de imunidade celular efetiva (GAZZINELLI; ROPERT; CAMPOS, 2004).

Os mecanismos que destacam a capacidade das leishmanias de contornar as defesas do hospedeiro para obter acesso e se multiplicar intracelularmente são surpreendentemente complexos e diversificados. A infecção não depende apenas das espécies e virulência do parasito, mas também da subpopulação de macrófagos e seu estado de ativação. As leishmanias são capazes de reconhecer e obter acesso ao interior do macrófago através de vários receptores fagocíticos, incluindo receptor de manose- fucose, receptores de complemento CR1 e CR3 e Fc. Além disso, os PAMPs mais comuns LPG e GIPLs, são reconhecidos por receptores do tipo *toll* (*Toll-like receptors*) de diferentes tipos de células, interferindo nas vias de sinalização (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

Outra classe importante de glicoconjugados a destacar são os GIPLs, o componente glicolipídico mais abundante da membrana celular das leishmanias e estruturalmente análogos à LPG (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993). Devido as suas próprias características estruturais, como modificações da cadeia lateral e substituições de ácidos graxos, estes podem ser classificados como uma família de moléculas metabolicamente distintas, em vez de um precursor ou subproduto de âncoras GPI. Semelhante ao LPG, GIPLs também são polimórficos nas estruturas glicanas e lipídicas, embora um núcleo básico

conservado esteja presente em todas as espécies de leishmanias estudadas. Consiste em um núcleo Man α 1-4GlcN, ligado a um alquil-acilglicerol ou um liso-alquilglicerol, através de um fosfatidilinositol. Diferente de outros tripanossomatídeos, não há substituição de ácidos graxos insaturados da porção lipídica (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

Estruturas GIPLs são comumente divididas em três grupos, dependendo se a substituição R-Man α 1- ocorre no terceiro, no sexto ou em ambos os carbonos. Quando ocorre a adição de R-Man α 1- no sexto carbono da manose proximal, as estruturas resultantes são classificadas como GIPLs do tipo I (principalmente GIPLs M2 e M3) que são estruturalmente relacionadas às âncoras de proteína GPI. Quando a substituição ocorre no terceiro carbono, os GIPLs resultantes são classificados como Tipo II (principalmente iM2, GIPL-1, GIPL-2, GIPL-3 e GIPL-A), que são estruturalmente relacionados à âncora de LPG. O tipo III é chamado de GIPLs híbrido, em que há substituições de R-Man α 1 nos terceiro e sexto carbonos do resíduo manose proximal (Fig. 09) (MCCONVILLE; FERGUSON, 1993).

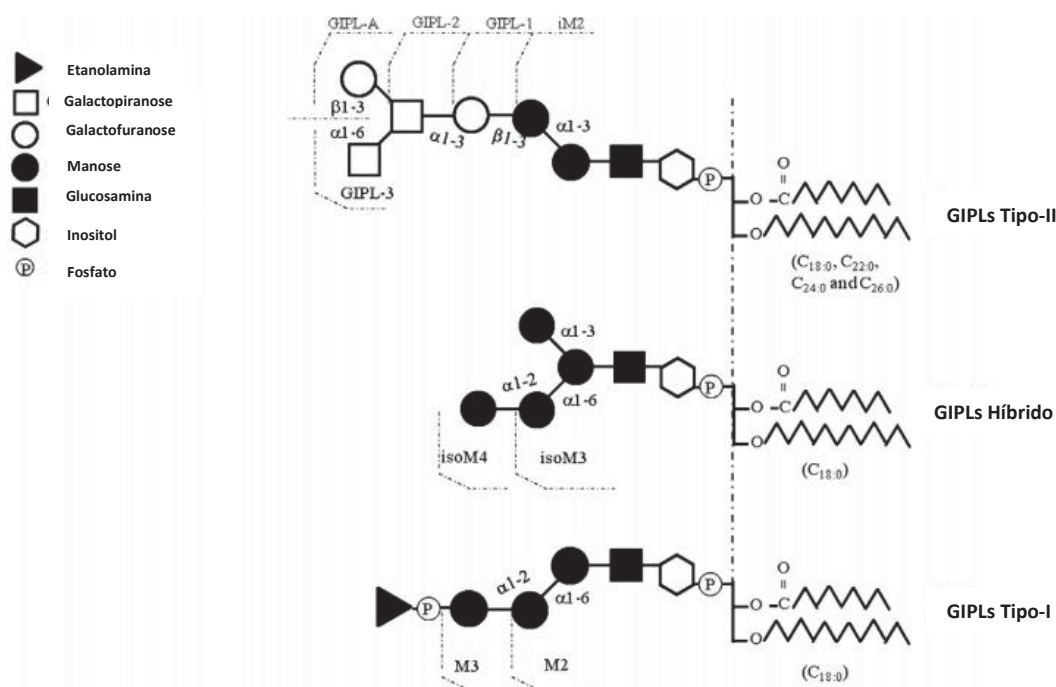


Fig. 09 Representação esquemática dos diferentes tipos de glicoinositolfolípeos (GIPLs). Fonte: modificado de (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

Embora os GIPLs sejam expressos em um número alto de cópias, sua função na biologia das leishmanias ainda não está completamente elucidada. Como essas moléculas compartilham uma maquinaria enzimática celular comum às âncoras GPI (glicosilfosfatidilinositol), é difícil determinar experimentalmente sua relevância específica na biologia geral das leishmanias. Ao contrário do LPG, somente poucos estudos estão disponíveis envolvendo a interação entre os GIPLs e o vetor, sendo este um campo aberto a ser explorado (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

A primeira vez que os GIPLs de leishmanias foram associados a um possível papel na infecção foi em 1990, através da demonstração de que os GIPLs poderiam interagir com fatores humorais no hospedeiro vertebrado. Pacientes infectados por *L. major* apresentaram altos títulos de anticorpos anti- α -galactosil (MCCONVILLE; HOMANS; THOMAS-OATES; DELL *et al.*, 1990). Isso foi confirmado posteriormente em outras espécies, como *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. braziliensis* (AVILA; ROJAS; ACOSTA, 1991).

No estudo realizado com GIPLs de *L. braziliensis*, foi descrito que esses não estão distribuídos aleatoriamente por toda membrana plasmática, mas sim associados a microdomínios especializados. A depleção dessas estruturas nesta espécie reduziu a infectividade *in vitro* de macrófagos (YONEYAMA; TANAKA; SILVEIRA; TAKAHASHI *et al.*, 2006). Além disso, verificou-se que GIPLs de *L. infantum* e *L. braziliensis* inibem diferencialmente a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos de camundongos estimulados com interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS), sem efeito na liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (ASSIS; IBRAIM; NORONHA; TURCO *et al.*, 2012). Essa observação é uma evidência importante de que os GIPLs de leishmanias interferem nos sinais regulatórios que podem modular a resposta da célula hospedeira. Embora as estruturas dos GIPLs de *L. infantum* e *L. braziliensis* não estejam totalmente elucidadas, a análise qualitativa preliminar da composição de monossacarídeos indica que o primeiro é muito semelhante ao tipo I ou híbrido, enquanto o último é consistente com um GIPL do tipo II (ASSIS; IBRAIM; NORONHA; TURCO *et al.*, 2012).

Finalmente, estudos tem atribuído uma grande importância dos glicoconjugados na biologia das leishmanias. As estruturas dessas moléculas exibem um polimorfismo surpreendente. Além disso, a expressão dos

glicoconjugados varia de acordo com o estágio dependente do hospedeiro, podendo modular uma variedade de mecanismos para evitar a destruição dos parasitos. É intrigante como a estrutura e a biologia destas moléculas evoluiu nas leishmanias, especialmente no subgênero *Viannia*, onde mecanismos únicos de interação ocorrem no hospedeiro vertebrado e invertebrado. Entender os mecanismos de como essas moléculas modulam importantes interações parasito-hospedeiro podem resultar em estratégias alternativas de controle da infecção (DE ASSIS; IBRAIM; NOGUEIRA; SOARES *et al.*, 2012).

2.1.4 LEISHMANIOSES

2.1.4.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Por leishmaniose tegumentar entendem-se as enfermidades causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem a pele e/ou mucosas do homem e de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões quentes e menos desenvolvidas do Velho e do Novo Mundo. Nas Américas, são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus* (Fig. 10), que no Brasil recebem as denominações: cangalhinha, birigui, mosquito-palha, asa dura, asa branca, catuqui, catuquira, escangalhado e murutinga (RANGEL; LAINSON, 2009). A infecção se caracteriza pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear da derme e mucosas do hospedeiro vertebrado (RANGEL; LAINSON, 2009).



Fig. 10 Fêmea da *Lutzomyia* spp. transmissor de *Leishmania* spp. Fonte: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SAGF-8ACMCM/1/disserta__o__vladimir_fazito_do_vale.pdf (2008).

A leishmaniose mucocutânea é uma forma grave de LT em que o principal agente causador é a *L. braziliensis*, com casos descritos desde o início do século passado (PESSOA; VILLELA, 1948). Nesta forma de apresentação da doença, o acometimento do tecido mucoso pela *L. braziliensis* é geralmente secundário a úlcera cutânea primária, o que se deve a disseminação dos parasitos por via linfática ou hematogênica. Evidências do envolvimento hematogênico foram obtidas pela cultura de leucócitos do sangue periférico de um paciente com a doença aparentemente adquirida no Equador (BOWDRE; CAMPBELL; WALKER; TART, 1981). Na sua forma inicial, a doença se apresenta como uma úlcera cutânea crônica (úlceras tropicais) nos membros inferiores, antebraço, tronco ou face. Antes ou após a regressão da úlcera, às vezes até anos depois, lesões secundárias úmidas, com ou sem formação de úlcera, surgem ao redor ou perto das junções mucocutâneas na laringe, septo nasal, região anal ou vulva, podendo ser destrutivas e deformantes. Tais lesões sofrem exacerbações e remissões espontâneas e costumam durar por um período mais longo (Fig. 11) (AMEEN, 2010).

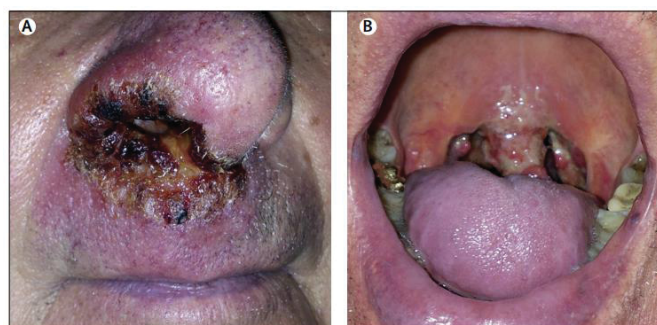


Fig. 11 Leishmaniose mucocutânea, paciente alemão com história de viagem ao Panamá. (A) Lesão que afeta a narina direita e o lábio superior. (B) Lesões que afetam a úvula e a região adjacente palato. Fonte: Burza *et al.* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

2.1.4.1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. É considerada pela

Organização Mundial da Saúde (OMS), como uma das seis mais importantes doenças infecciosas (SAÚDE, 2017).

No Brasil, a LT é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção, devido à sua magnitude, assim como pelo risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano, e também pelo envolvimento psicológico, com reflexos no campo social e econômico, uma vez que, na maioria dos casos, pode ser considerada uma doença ocupacional. Apresenta ampla distribuição, com registro de casos em todas as regiões brasileiras (Fig. 12) (SAÚDE, 2017).

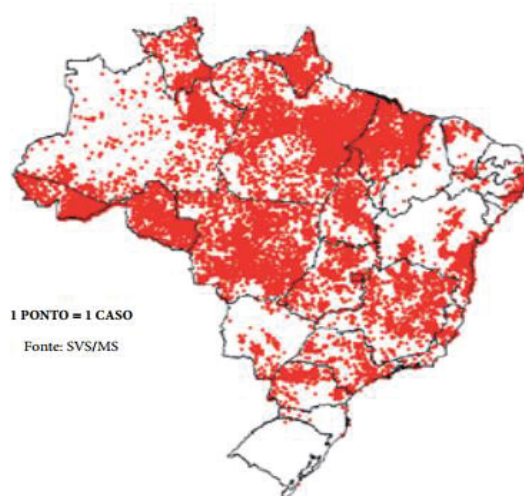
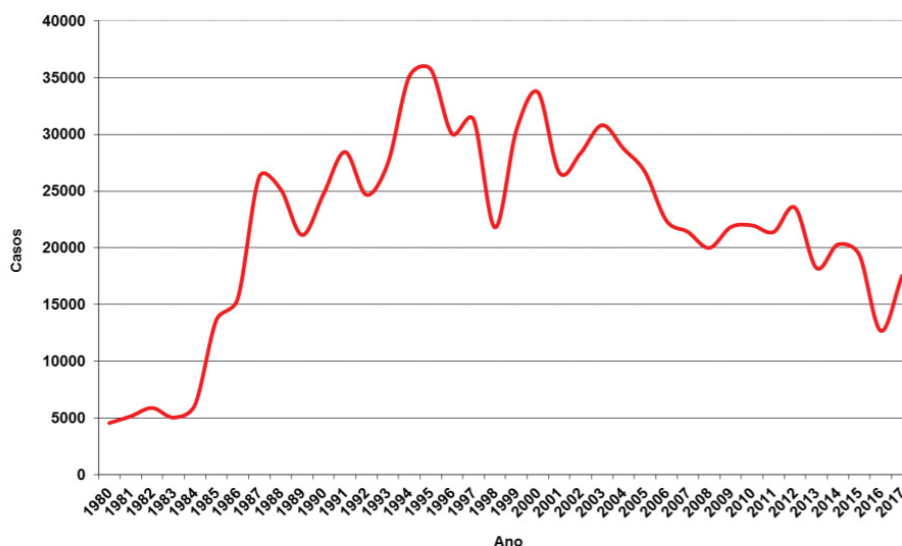


Fig. 12 Casos de Leishmaniose tegumentar por município no Brasil em 2015. Fonte: Manual de vigilância leishmaniose tegumentar 2017 (SAÚDE, 2017).

A partir da década de 1980, verificou-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Observam-se picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos, a partir do ano de 1985, quando se solidifica a implantação das ações de vigilância e controle da LT no país. (Fig. 13) (SAÚDE, 2017).



Fonte: SVS/MS.

Fig. 13 Casos confirmados de Leishmaniose Tegumentar no Brasil de 1980 a 2017. Fonte: Manual de vigilância leishmaniose tegumentar 2017 (SAÚDE, 2017).

2.1.4.1.2 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O processo de instalação da LT no hospedeiro é determinado por uma complexa associação entre os fatores relacionados à virulência do parasito, e a resposta imunológica do hospedeiro. Atribuiu-se ao sistema imunológico, uma função importante no controle da reativação da doença, após longos períodos de desaparecimento das lesões primárias (WALTON; CHINEL; EGUIA Y EGUIA, 1973). O sistema complemento desempenha uma importante função na LT já nos primeiros instantes após a inoculação das promastigotas no hospedeiro. A sua atuação leva a deposição de fragmentos de ativação do complemento sobre o parasito, os quais são essenciais para o estabelecimento da doença. Nas leishmanioses, a resposta imune é predominantemente mediada por células, a qual envolve todos os mecanismos associados à cura, proteção ou ao agravamento da doença. A função dos linfócitos T com fenótipo $CD4^+$ (Th1 e Th2) é importante na instalação da doença. Os linfócitos Th1 produzem $IFN-\gamma$, interleucina 2 (IL-2), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e $TNF\alpha$, que levam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitos. Por outro lado os linfócitos Th2, produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, que inibem a ativação de macrófagos e levam a ativação de linfócitos B com

a produção de anticorpos preferencialmente das classes IgG1 e IgE, enquanto que Th1 auxilia na produção de anticorpos do isotipo IgG2 (COUTINHO; OLIVEIRA; DA-CRUZ; DE LUCA *et al.*, 1996; DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Na fase ativa da leishmaniose tecido-localizada produzida pela *L. braziliensis*, predomina uma resposta de linfócitos T CD4⁺, com produção de citocinas de “tipo 1” e “tipo 2” (IFN- γ , IL-2 e IL-4). No processo de cura, ocorre um aumento da resposta de células CD8⁺ e um padrão de citocinas de “tipo 1” (COUTINHO; OLIVEIRA; DA-CRUZ; DE LUCA *et al.*, 1996; DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Formas graves de infecção envolvendo as mucosas, evoluem com uma resposta celular aumentada, caracterizada pela alta produção de IL-4 e IFN- γ , mesmo com poucos parasitos nas lesões. Diante disto, sugere-se que a intensidade de destruição tecidual e o padrão de lesão observado é provocado majoritariamente pelo sistema imunológico, e não pelos parasitos (COUTINHO; OLIVEIRA; DA-CRUZ; DE LUCA *et al.*, 1996; DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

2.1.4.2 LEISHMANIOSE VISCERAL

A leishmaniose visceral é causada pela *L. infantum* (syn. *chagasi*) na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, América do Sul e Central e pela *L. donovani*, na Ásia e África. Esta doença é caracterizada por febre irregular e esplenomegalia. Pacientes em estado avançado da doença podem apresentar: pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e perda de peso. A hipergamaglobulinemia inclui anticorpos não protetores anti-leishmania e anticorpos autoimunes, o que pode dificultar o diagnóstico, especialmente em viajantes e migrantes. A LV pode ser aguda ou insidiosa com período de incubação de 2 semanas a 8 meses. Sem tratamento, a doença é geralmente fatal em 2 anos, devido a infecções bacterianas secundárias e grave anemia. Não obstante, pacientes infectados podem desenvolver sintomas anos depois, em condições de imunossupressão (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A LC pós LV (também conhecida como pós Kalazar) é uma complicação tardia da doença causada pela *L. donovani*. Raramente é observada em indivíduos infectados com *L. infantum*, porém, é típica em imunocomprometidos

(STARK; PETT; MARRIOTT; HARKNESS, 2006). Na leishmaniose pós Kalazar, os parasitos persistem na epiderme após o tratamento. Os pacientes apresentam máculas hipopigmentadas e/ou erupção maculopapular eritematosa ao redor da boca e o tronco, que pode se estender gradualmente para o corpo inteiro (Fig. 14). Na Ásia, 90% dos casos têm o tipo macular enquanto na África predomina a erupção papular (ZIJLSTRA; MUSA; KHALIL; EL-HASSAN *et al.*, 2003).



Fig. 14 Erupção maculopapular eritematosa (A e B); e mácula hipopigmentada (C) em pacientes com leishmaniose cutânea pós Kalazar. Fonte: Burza *et al.* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

2.1.4.2.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Em 2015, sete países (Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão), relataram 90% dos casos mundiais de LV. No entanto, a LV se mantém endêmica em mais de 60 países (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

No Brasil, a LV inicialmente apresentava um caráter rural, mas, nos últimos anos, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte (SAÚDE; SAÚDE, 2017). A LV está presente em todas as regiões brasileiras (Fig. 15). A partir da década de 90, o número de casos aumentou, sendo que em 2017 foram registrados 4.103 casos (Fig. 16), 40,9% em crianças (0-9 anos), 7,8% dos pacientes coinfectados com HIV e taxa de mortalidade de 8,8% (SAÚDE; SAÚDE, 2017).

2.1.4.2.2 IMUNOLOGIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL

A susceptibilidade a LV não está associada a idade, sexo e etnia em humanos. Entretanto, crianças e idosos são mais suscetíveis a LV. Pacientes com LV apresentam resposta humoral com presença de anticorpos circulantes com pouca importância na defesa do hospedeiro (SAÚDE; SAÚDE, 2017). A *L. infantum* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocitário mononuclear e sua presença determina uma supressão reversível e específica da imunidade mediada por células, o que permite a disseminação e multiplicação do protozoário (SAÚDE; SAÚDE, 2017). Um pequeno percentual dos indivíduos infectados desenvolve sinais e sintomas da doença, os demais poderiam ser caracterizados com resistentes ou portadores da infecção latente. Nos indivíduos que não desenvolvem a doença, observa-se que os exames que pesquisam imunidade celular ou humoral permanecem reativos por longo período. Como isso requer a presença de antígenos, pode-se concluir que a *L. infantum*, ou alguns de seus antígenos, estão presentes no hospedeiro durante longo período após a infecção inicial. Esta hipótese está apoiada no fato de que indivíduos que desenvolvem alguma imunossupressão podem apresentar quadro de LV, muito além do período habitual de incubação (SAÚDE; SAÚDE, 2017).

2.1.5 DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser realizado através da pesquisa de anticorpos, utilizando técnicas como imunofluorescência indireta, ELISA e imunocromatografia. Um cuidado especial na interpretação dos testes sorológicos é que os títulos de anticorpos da classe IgG se mantêm altos por longos períodos após a cura, logo pacientes sem manifestações clínicas não devem ser medicados. O diagnóstico parasitológico é confirmatório, e consiste no isolamento de formas amastigotas dos materiais biológicos como medula óssea, linfonodos e baço (SAÚDE; SAÚDE, 2017).

Na ocorrência de lesões sugestivas de LT, o diagnóstico presuntivo pode ser baseado em critérios clínicos e epidemiológicos. Entretanto, este deve ser complementado por pesquisa direta do parasita na lesão, isolamento em cultura (*in vitro*), isolamento por inoculação em animais (*in vivo*), utilizando técnicas da reação em cadeia da polimerase, exames histopatológicos ou intradermoreação

de Montenegro e, eventualmente, pela prova terapêutica, que consiste no tratamento do paciente e observação da melhora clínica (SAÚDE, 2017).

2.1.6 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Para tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar os medicamentos recomendados pelo ministério da saúde brasileiro são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B na forma desoxicolato e lipossomal. Estas drogas apresentam toxicidade elevada e necessidade de cuidados especiais de conservação, aplicação e monitoramento dos efeitos colaterais, que revelam a falta de investimento em novos tratamentos para estas doenças (SAÚDE; SAÚDE, 2017). Outros medicamentos usados no tratamento da leishmaniose visceral, são as pentamidinas (isotionato e mesilato) principalmente na Europa e África. Sua eficácia é inferior à dos antimoniais pentavalentes e anfotericina B (SAÚDE; SAÚDE, 2017). Recentemente uma droga oral (miltefosine) vem sendo utilizada na Índia, com resultados promissores no tratamento do Kalazar indiano (SAÚDE, 2017). A pentoxifilina é um fármaco da classe de vasodilatadores periféricos, pesquisas têm demonstrado sucesso no emprego como coadjuvante (imunomodulador) no tratamento da LT, com cura em menor tempo quando comparado ao tratamento convencional logo, não tem indicação como medicamento isolado, mas sim em associação ao antimoniato de meglumina. (SAÚDE, 2017).

Diante disso, fica evidente a característica negligenciada das leishmanioses, devido à escassez de tratamentos e a alta toxicidade das drogas disponíveis.

2.2 SISTEMA COMPLEMENTO

A alta complexidade do sistema imunológico humano não fornece apenas defesa contra agentes agressores, mas também proteção contra resposta indesejada a componentes do próprio organismo. O sistema imunológico, embora dividido didaticamente em duas partes: inata e adaptativa, atua de forma interligada. A resposta imune inata fornece a primeira linha de defesa, possui especificidade limitada, utiliza mecanismos celulares, humorais e mecânicos contra os patógenos (DUNKELBERGER; SONG, 2010). Nesse contexto, o sistema complemento se caracteriza como essencial, participando de

importantes funções, incluindo: reconhecimento de microrganismos invasores, depuração de complexos imunes e células alteradas, lise de células alvo, promoção da resposta inflamatória e ligação entre a imunidade inata e adaptativa (WALPORT, 2001).

O sistema complemento consiste em mais de 50 proteínas que incluem proteínas plasmáticas, receptores do complemento na superfície de células e proteínas reguladoras. A maioria dos componentes plasmáticos circulam na forma inativa, como pró-enzimas ou zimogênios (RICKLIN; HAJISHENGALLIS; YANG; LAMBRIS, 2010). Após clivagem, as moléculas inativas se tornam ativadas, resultando em uma cascata proteolítica que origina funções efetoras como: fagocitose, inflamação, lise de células e orientação para a resposta imune adaptativa (Fig. 17) (RICKLIN; HAJISHENGALLIS; YANG; LAMBRIS, 2010). Uma vez que a ativação do complemento conduz a efeitos potencialmente devastadores, se faz necessário um sistema de controle eficaz para evitar danos aos tecidos do hospedeiro (KASK; VILLOUTREIX; STEEN; RAMESH *et al.*, 2004). Assim, uma resposta efetiva do complemento depende de um equilíbrio entre o mecanismo de ativação e regulação, direcionado para a destruição do microrganismo invasor e que cause poucos danos a células e tecidos, uma vez que qualquer desequilíbrio pode conduzir a injúrias potencialmente graves (WALPORT, 2001).

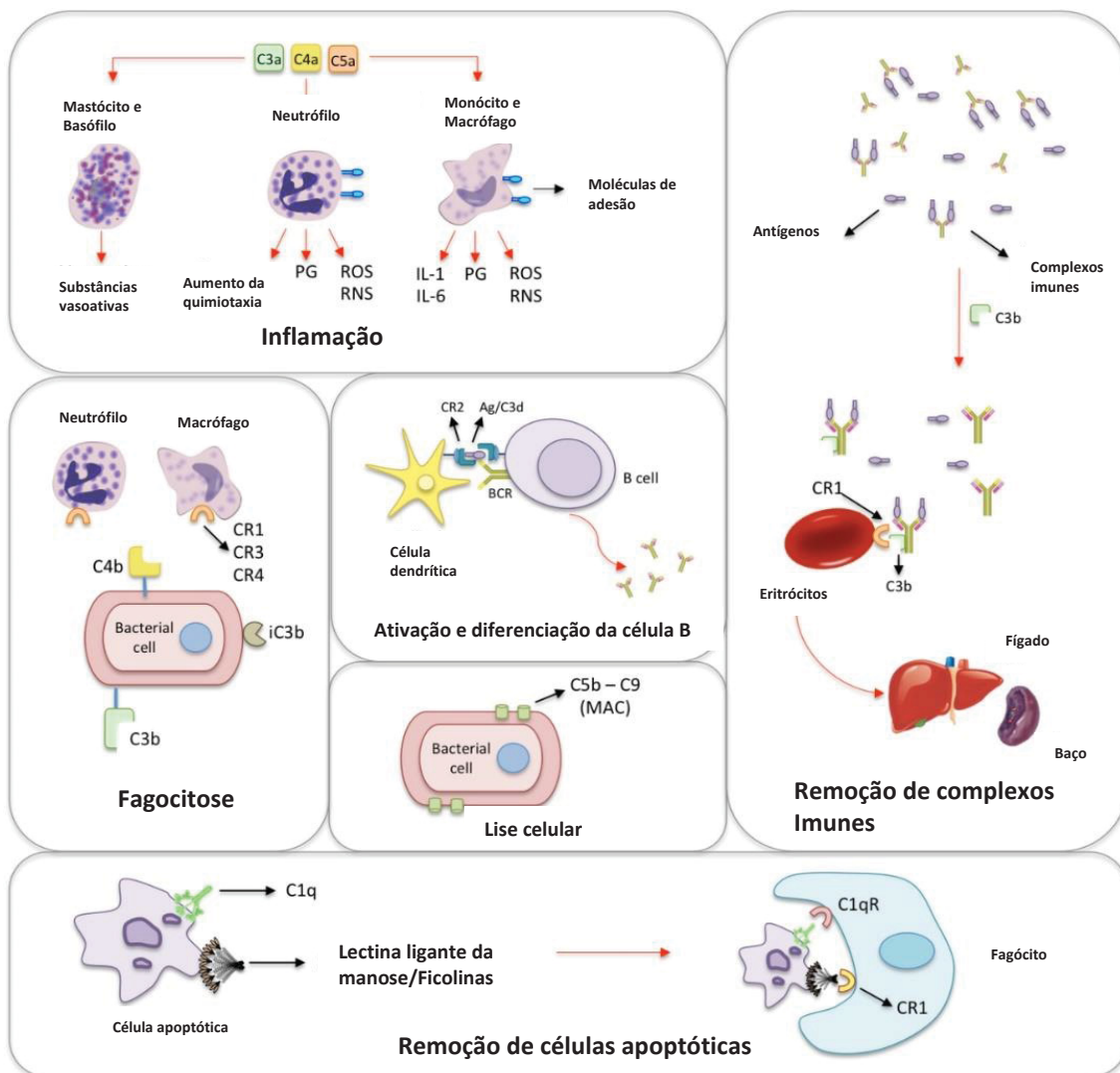


Fig. 17: Funções do Sistema Complemento: inflamação, fagocitose, ativação e diferenciação da célula B, lise de patógenos, remoção de complexos imunes e de células apoptóticas. Fonte: modificado de Beltrame *et al.* 2015 (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014).

A ativação do complemento ocorre na superfície de patógenos ou células danificadas/infectadas através de três vias distintas: alternativa, clássica e das lectinas. Todas as vias são iniciadas por estímulos independentes e na sequência da cascata proteolítica convergem para a clivagem do componente principal C3, que no final resulta na montagem do complexo de ataque à membrana (MAC) (Fig. 18) (BLOM; VILLOUTREIX; DAHLBÄCK, 2004). A via clássica é iniciada a partir da interação entre o componente C1q e a região constante (Fc) da IgM ou IgG (ALI; LYNCH; HALEEM; FUJITA *et al.*, 2012; CHEN; DAHA; KALLENBERG, 2010). Por outro lado, a via alternativa se inicia pela hidrólise espontânea de C3 no plasma (CHEN; DAHA; KALLENBERG,

2010). A via das lectinas pode ser ativada na ausência de complexos imunes. Ela é iniciada pela ligação da MBL, CL-11 ou ficolinas a carboidratos ou resíduos acetilados presentes em microrganismos ou padrão aberrante do glicocálice de células apoptóticas, necróticas ou malignas (ALI; LYNCH; HALEEM; FUJITA *et al.*, 2012). A via das lectinas também possui papel importante na coagulação sanguínea através da ligação do complexo MBL-serino protease associada à MBL (MASP) ou ficolina-MASP ao fibrinogênio ou fibrina (DEGN; JENSENIUS; BJERRE, 2011; JENSENIUS, 2005).

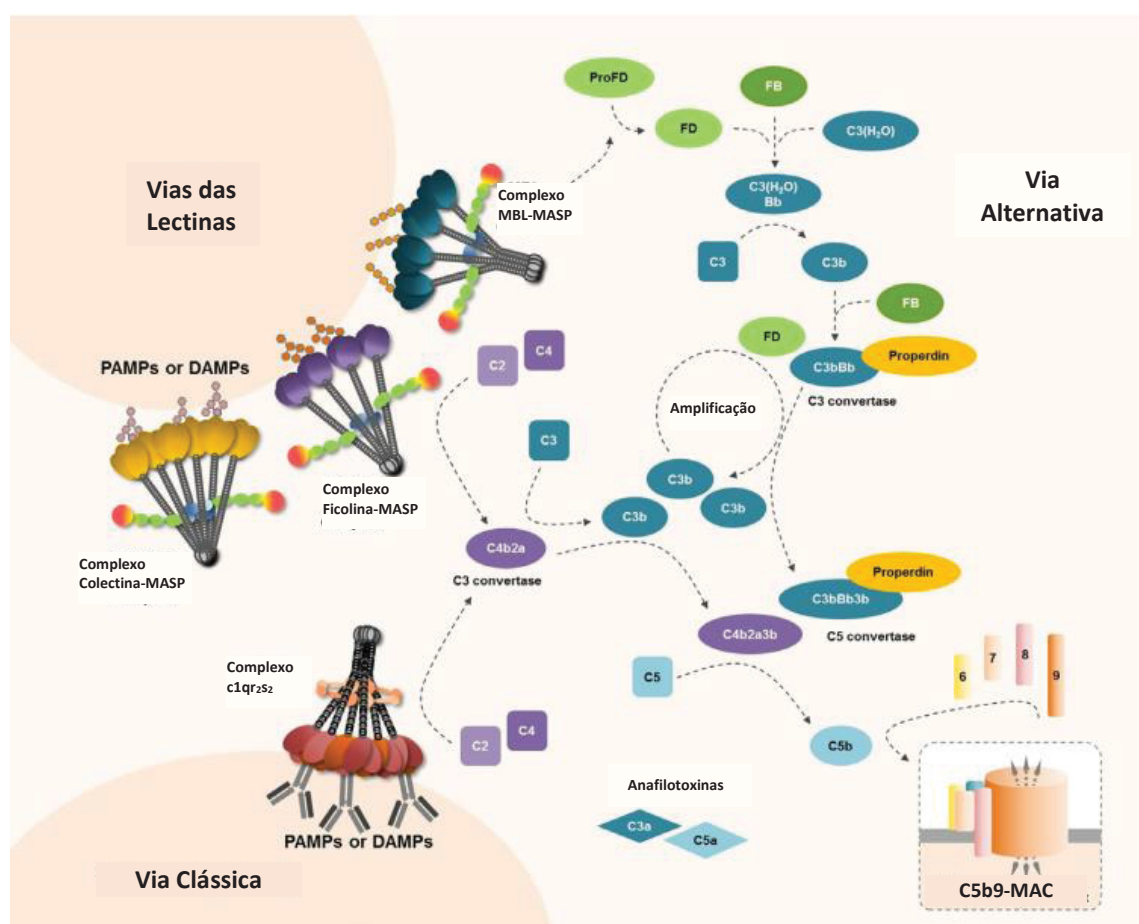


Fig. 18: Visão geral do sistema de complemento. As três vias de ativação do complemento: Clássica, Alternativa e das Lectinas. Fonte: modificada de Garred *et al.* (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

2.2.1 VIA DAS LECTINAS

A via das lectinas é a via de ativação do complemento mais recentemente descoberta. A MBL, a CL-11 e as ficolinas são os principais componentes iniciadores da via das lectinas. A atividade antimicrobiana da MBL tem sido amplamente estudada, devido a sua capacidade de reconhecimento de

diferentes microrganismos, incluindo fungos, bactérias, vírus e protozoários (ENDO; MATSUSHITA; FUJITA, 2015). Tanto a MBL, como CL-11 e ficolinas atuam como PRRs solúveis. Estas são proteínas oligoméricas de defesa, com atividade de lectina, capazes de reconhecer PAMPs, que são moléculas de carboidratos presentes na superfície dos patógenos. Além disso, reconhecem DAMPs em células apoptóticas, necróticas ou malignas. Os PRRs podem ser solúveis ou ligados a membranas. PRRs solúveis também são chamados de opsoninas, e além da MBL, CL-11, ficolinas-1, -2, -3, incluem a proteína C reativa e a proteína amiloide sérica. Após a ligação dos PRRs a patógenos ou células alvo, eles facilitam seu reconhecimento e consequente remoção por fagocitose. Portanto, os PRRs possuem importante papel na resposta imune inata, incluindo opsonização, fagocitose, indução da apoptose, ativação do complemento, coagulação e inflamação (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; REN; DING; ZHANG, 2014).

A via das lectinas é iniciada quando os PRRs ligam-se a PAMPs (D-manose, N-acetil-D-glucosamina ou grupos acetil) na superfície de patógenos ou células apoptóticas ou necróticas (DEGN; JENSENIUS; BJERRE, 2011; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016). MBL, CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 circulantes formam complexos com dois dímeros de MASPs, MASP-1 e MASP-2. Após a ligação dos complexos MBL/MASPs, CL-11/MASPs ou ficolinas/MASPs ao alvo, MASP-1 se auto ativa e trans-ativa MASP-2, conduzindo a clivagem de C4 e C2. Esta sequência de eventos leva a formação das C3 (C4b2a) e C5 (C4b2a3b) convertases com subsequente clivagem de C3 e C5 e formação de C3a e C5a, duas anafilotoxinas pró-inflamatórias, intensificando a resposta inflamatória. O fragmento C3b produzido por ativação das três vias se liga covalentemente a grupos hidroxila e amina da molécula alvo. Dessa forma C3b marca antígenos/patógenos alvos para células que realizam apresentação de antígenos, ou para destruição através da fagocitose, por interação com receptores de membrana do complemento como CR1, CR2, CR3 e CR4 e um membro da superfamília das imunoglobulinas, CR1g. Finalmente, a cascata do complemento culmina com a formação do complexo multiproteico (C5b, C6, C7, C8 e C9n) conhecido como MAC, que é capaz de formar poros na membrana celular do microrganismo, destruindo sua integridade e conduzindo a

morte celular (Fig. 18) (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

2.2.2 LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL)

A MBL é uma molécula central de reconhecimento da via das lectinas. Ela é sintetizada no fígado e secretada no sangue como um complexo multimérico de alto peso molecular, possuindo importante função como proteína de fase aguda na imunidade inata e na eliminação de patógenos (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; JENSEN; LAURSEN; MATTHIESEN; HØJRUP, 2007). Sua estrutura é basicamente formada por um trímero de cadeias polipeptídicas, cada uma contendo um domínio N-terminal rico em cisteína, uma região de colágeno, uma região de pescoço e uma porção C terminal, o domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (do inglês, *carbohydrate recognition domain*). Um único trímero de MBL não é totalmente funcional. De fato, estes se associam de modo que a forma predominante na circulação é o tetrâmero de trímeros (Fig. 19). O reconhecimento e ligação da MBL aos alvos ocorre pelo domínio CRD e a configuração oligomérica confere uma multivalência e uma ligação com alta afinidade (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; HOLMSKOV; THIEL; JENSENIUS, 2003).

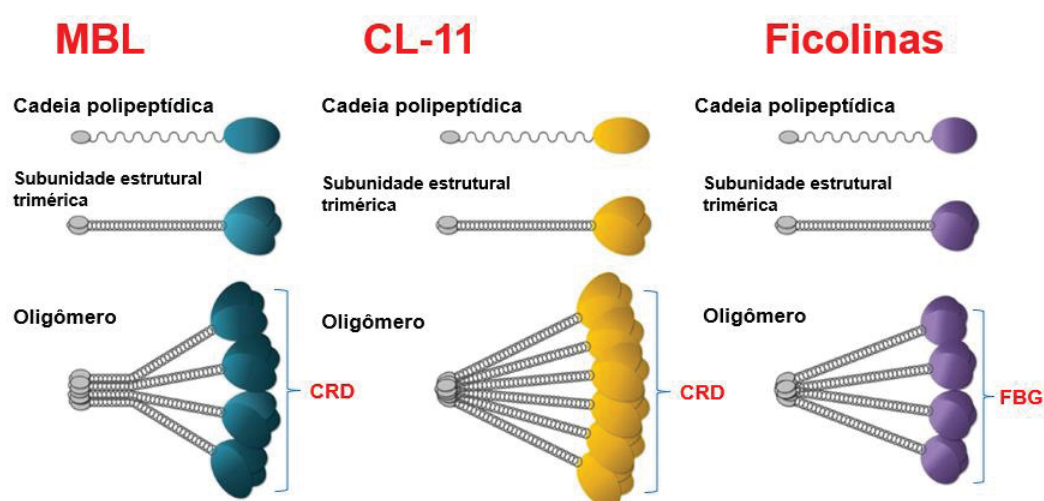


Fig. 19: Estrutura molecular da MBL, CL-11 e ficolinas-1, -2, -3. Fonte: modificada de Garred *et al.* (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

A MBL faz parte da família das colectinas, conhecida como uma lectina do tipo C (BOHLSON; FRASER; TENNER, 2007; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016). Na sua forma ativa e na presença de cálcio, reconhece sequências repetitivas de açúcares em organismos patogênicos como vírus, bactérias, fungos, protozoários, parasitos multicelulares, bem como células tumorais e apoptóticas. Apesar do seu nome, a MBL não liga somente a manose e seus multímeros, mas também reconhece açúcares com grupos 3 e 4-OH localizados no plano equatorial do anel, que incluem glicose, L-fucose, N-acetilmanosamina e N-acetilglucosamina (Glc-NAc), porém não a galactose. A MBL pode também se ligar a fosfolipídios, ácidos nucleicos e proteínas não glicosiladas (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

Durante a resposta aguda, os níveis séricos de MBL podem aumentar até três vezes, devido à regulação positiva dos mediadores de fase aguda (IL-1, TNF- α , IFN- γ). Os níveis séricos da MBL variam de poucos nanogramas por mililitro até 10 $\mu\text{g/mL}$, com valores médios de 0,8 $\mu\text{g/mL}$. Os níveis séricos dos multímeros da MBL são dependentes de polimorfismos no gene *MBL2*, responsáveis por variações individuais de até 10 vezes nos níveis séricos. Além disso, os níveis de MBL podem modificar durante a vida (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

2.2.3 COLECTINA-11 (CL-11, CL-K1)

A CL-11 está ubiquamente expressa em diversos órgãos do corpo humano, mas com níveis mais altos nas glândulas suprarrenais, fígado e rins. É uma molécula de reconhecimento de padrões multifuncional, com participação na defesa do organismo, na homeostasia dos tecidos e na embriogênese. Quando associada às MASP 1 e 2, se liga a PAMPs, ativando a via das lectinas. Também se liga a células apoptóticas e pode atuar como receptor *scavenger* facilitando a eliminação de debris celulares, assim como as outras colectinas. A concentração plasmática da CL-11 em diferentes grupos étnicos, revelou uma média de 0,3 $\mu\text{g/mL}$ (SELMAN; HANSEN, 2012; TAKAHASHI; OHTANI; LARVIE; MOYO *et al.*, 2014; YOSHIZAKI; OHTANI; MOTOMURA; JANG *et al.*, 2012). Concentrações séricas elevadas estão associadas com a coagulação

intravascular disseminada (VENKATRAMAN GIRIJA; FURZE; GINGRAS; YOSHIZAKI *et al.*, 2015).

CL-11 é membro da família das colectinas com uma região N terminal de colágeno, unida a uma porção C terminal com um CRD, via região de pescoço helicoidal. As regiões de colágeno se associam para formar a estrutura característica (Fig. 19). A CL-11 pode formar homo-oligômeros ou hetero-oligômeros com a colectina-L1 (CL-L1, CL-10), similar a ela. O cálcio desempenha papel essencial na sua atividade. A CL-11 se liga a uma variedade de bactérias, fungos e vírus como: *Escherichia coli*, *Candida albicans* e vírus influenza A. Também se liga ao DNA, o que explica pelo menos em parte, ter como alvo, células apoptóticas. Apesar da ligação ser seletiva para manose e fucose, a CL-11 pode se associar fracamente a monossacarídeos. Quando comparada com MBL e ficolinas, pouco se conhece a respeito da sua ligação a oligossacarídeos próprios e não próprios (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; HANSEN; SELMAN; PALANIYAR; ZIEGLER *et al.*, 2010).

2.2.4 FICOLINAS (Ficolina-1/M, Ficolina-2/L e Ficolina-3/H)

Semelhantemente à MBL e CL-11, as ficolinas são PRRs capazes de se associar com MASP's e ativar o complemento através da via das lectinas. Além disso, elas podem estimular a secreção pelos macrófagos de IFN- γ , IL-17, IL-6, TNF- α e NO limitando a infecção e orquestrando, simultaneamente, a subsequente resposta imunológica adaptativa (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; REN; DING; ZHANG, 2014).

Estruturalmente, as ficolinas são formadas por quatro subunidades triméricas oligoméricas ligadas por pontes dissulfeto à região N-terminal, semelhantes a MBL, mas oligômeros maiores ou menores são menos comuns nas ficolinas (Fig. 19) (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; HOLMSKOV; THIEL; JENSENIUS, 2003). Ficolinas não deveriam ser chamadas de lectinas, pois se ligam a alvos acetilados que não são, apenas, carboidratos (GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016; KRARUP; THIEL; HANSEN; FUJITA *et al.*, 2004). São descritas três ficolinas humanas, cada uma codificada por um gene próprio.

A ficolina-1 é encontrada associada à membrana celular de monócitos e neutrófilos ou solúvel no plasma, numa concentração de 0,05 – 1 µg/mL. A ficolina-1 também está presente nos grânulos secretórios dos monócitos, grânulos de gelatinase nos neutrófilos e na célula epitelial alveolar do tipo II. Esta proteína é secretada no plasma pelos monócitos e neutrófilos, onde atua na defesa local. Possui capacidade de reconhecimento de compostos acetilados comuns incluindo: Glc-NAc e N-acetil galactosamina, ligando-se a vários microrganismos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. É a única ficolina humana capaz de se ligar ao ácido siálico encontrado na cápsula polissacarídica de alguns patógenos, como o *Streptococcus agalactiae*, bem como na superfície de células imunes (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016). Acredita-se que a ficolina-1 atue modulando a interação entre células do sistema imune (GOUT; GARLATTI; SMITH; LACROIX *et al.*, 2010) e na coagulação e/ou fibrinólise (TANIO; KONDO; SUGIO; KOHNO, 2007). Interessantemente, a ficolina-1 forma um heterocomplexo com pentraxina 3, que atua como sinal não inflamatório, promovendo a retirada de células próprias alteradas por macrófagos e modulando negativamente a produção de IL-8 (MA; DONI; ROMANI; JÜRGENSEN *et al.*, 2013).

A ficolina-2 é uma proteína plasmática, sintetizada principalmente no fígado. Transcritos de ficolina-2 foram também encontrados na medula óssea, intestino, tonsilas e no pulmão fetal; sua concentração plasmática é de 1-12 µg/mL (HUMMELSHOJ; FOG; MADSEN; SIM *et al.*, 2008). É capaz de se ligar a moléculas N-acetiladas como Glc-NAc, N-acetil galactosamina e N-acetil lactosamina, bem como a compostos artificiais acetilados. Liga-se também ao ácido N-acetilneuramínico presente em patógenos oportunistas encapsulados como estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*), peptidioglicana bacteriana, 1,3-beta-glucana fúngica e glicoproteínas do envelope do vírus da hepatite C. Além disso, foi demonstrado que a ficolina-2 se liga ao *Mycobacterium bovis* e a protozoários flagelados, como *Giardia intestinalis* e *Trypanosoma cruzi*. Também interage com a proteína C reativa, estabilizando a sua ligação ao microrganismo e ativando o complemento (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

A ficolina-3 é a mais abundante das moléculas de reconhecimento da via das lectinas. Possui uma concentração plasmática média de 18,4 µg/mL, com variação entre os indivíduos de até 10 vezes (3-54 µg/mL). Está expressa em grandes quantidades no fígado e pulmão, indicando sua importância na ativação do complemento e na defesa pulmonar do hospedeiro. Por esta razão, ela possui importante papel na resposta imune sistêmica e local. A ficolina-3 reconhece grupos acetilados presentes em vários microrganismos, incluindo *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, *Escherichia coli* e *Aerococcus viridans*. A ficolina-3 também é capaz de competir pelo sítio de ligação da ficolina-2 e MBL na superfície da *Giardia intestinalis*. Como as demais ficolinas, esta proteína tem a capacidade de mediar a remoção de células apoptóticas, possuindo papel benéfico contra autoimunidade (BELTRAME; CATARINO; GOELDNER; BOLDT *et al.*, 2014; GARRED; GENSTER; PILELY; BAYARRI-OLMOS *et al.*, 2016).

2.3 LEISHMANIAS & SISTEMA COMPLEMENTO

Vários estudos demonstraram que o sistema complemento desempenha um importante papel nos estágios iniciais da infecção por leishmanias (MOSSER; SPRINGER; DIAMOND, 1992). Quando formas promastigotas são inoculados em mamíferos, essas são expostas ao complemento presente no plasma, o que conseqüentemente conduz a lise ou a fagocitose destes parasitos. Nesse estágio, os parasitos são recobertos por fragmentos do sistema complemento como C3b e C3bi, os quais atuam como opsoninas na fagocitose por macrófagos, sendo reconhecidos por receptores do complemento CR1 ou CR3 (DA SILVA; HALL; JOINER; SACKS, 1989; WILSON; PEARSON, 1988). Desta maneira, a ativação do complemento e os receptores do complemento são importantes ferramentas utilizadas pelas leishmanias para invadir células fagocíticas. Na realidade, estudos *in vitro* demonstraram que na ausência do sistema complemento, ocorre falha na ligação de leishmanias a macrófagos (MOSSER; SPRINGER; DIAMOND, 1992). Moreno e colaboradores demonstraram que após a inoculação da *L. infantum* pelo vetor, o sistema complemento é um dos componentes da resposta imune inata que atua na destruição das formas promastigotas pela formação do MAC, na membrana celular do parasito (MORENO; MOLINA; TORAÑO; LAURIN *et al.*, 2007). A participação do complemento na fase inicial da infecção pela *L. infantum* tem

sido demonstrada em vários modelos experimentais, incluindo indução de reação inflamatória e fagocitose na pele de hamsters inoculados com *L. infantum* (LAURENTI; CORBETT; SOTTO; SINHORINI *et al.*, 1996), opsonização do parasito (DOMÍNGUEZ; MORENO; LÓPEZ-TRASCASA; TORAÑO, 2002; DOMÍNGUEZ; TORAÑO, 1999), demonstração da presença de inibidores do complemento na saliva de *Lu. longipalpis* (MENDES-SOUSA; NASCIMENTO; QUEIROZ; VALE *et al.*, 2013). Além disso, demonstrou-se que as culturas de promastigotas de *L. infantum* são suscetíveis a lise pelo complemento humano na fase logarítmica, porém, na fase estacionária tornam-se mais resistentes a esse efeito lítico (DAHLIN-LABORDE; SCOLARO; ROMINE; RAMER-TAIT *et al.*, 2008; DAHLIN-LABORDE; YU; BEETHAM, 2005; LINCOLN; OZAKI; DONELSON; BEETHAM, 2004).

Com relação às proteínas da via das lectinas, foi demonstrado que a MBL se liga a glicoconjugados na superfície da *L. braziliensis* e proporciona um mecanismo de ativação do complemento, independente de anticorpos (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005). Foi evidenciado que monócitos infectados com promastigotas de *L. infantum* opsonizadas por MBL secretaram níveis altos de TNF α e IL-6 *in vitro*. Além disso, altos níveis da MBL estão associados como fator de risco para desenvolvimento da infecção em portadores da *L. infantum* (SANTOS; COSTA; KRIEGER; FEITOSA *et al.*, 2001). Estudos de polimorfismos do gene da *MBL2* demonstraram que genótipos codificadores para altos níveis séricos de MBL estão associados à LV sintomática (ALONSO; FERREIRA; RIBOLLA; DE MIRANDA SANTOS *et al.*, 2007; ASGHARZADEH; MAZLOUMI; KAFIL; GHAZANCHAEI, 2007). Por outro lado, a presença do polimorfismo XY na região promotora -221 do gene *MBL2* (rs5030737, rs1800450 e rs1800451) está associada à proteção contra a infecção pela *L. infantum* (HAMDI; EJGHAL; IDRISSE; EZZIKOURI *et al.*, 2013). Outro estudo realizado em pacientes infectados com *L. donovani* demonstrou que a variante + 6359C> T (*p.T236M*) do gene *FCN2* (rs3124952, rs3124953, rs17514136 e rs17549193) está associada à susceptibilidade de LV e que os níveis séricos de ficolina-2 estão elevados em portadores da doença (MISHRA; ANTONY; SUNDARAVADIVEL; TONG *et al.*, 2015).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PARASITOS

Promastigotas da *L. braziliensis* cepa MHOM/BR/75/M2904 e *L. infantum* cepa MHOM/BR/1974/PP75, foram cultivados a 25°C em meio de Schneider's acrescidos de Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) (Sigma Chemicals Co., St Louis, MO, USA), suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (Gibco Laboratories, Paisley, Scotland), 100 µg/mL de estreptomicina e 2 UI/mL de penicilina. Os parasitos foram mantidos em cultura por 6 a 7 dias, para atingirem a fase estacionária de crescimento. Em seguida foram retirados da cultura, lavados 3 vezes em tampão Tris com 10 mM CaCl₂ (TBS-Ca) em baixa velocidade de centrifugação e avaliados microscopicamente quanto a viabilidade, integridade morfológica e presença de formas metacíclicas, para utilização nos experimentos.

3.2 ENSAIOS DO COMPLEMENTO

3.2.1 FONTE DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS HUMANAS

Foi utilizado um *pool* de soro humano normal (SHN) de dez indivíduos sem história de leishmaniose e imunofluorescência negativa para as promastigotas como fonte de proteína sérica do complemento. As proteínas humanas recombinantes ficolina-2 e CL-11 foram obtidas da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), ficolina-1, ficolina-3 e MBL pela Cloud-Clone Corp (Houston, TX, USA) e utilizadas nos ensaios de ligação.

3.2.2 INATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO NO SHN

Para alguns experimentos, foi efetuada a inativação do sistema complemento do SHN, através da incubação a temperatura de 56°C, durante 30 minutos. Este procedimento inativa o fator B e C2, bloqueando as três vias de ativação do complemento clássica, alternativa e das lectinas.

3.2.3 ADSORÇÃO DO SHN

O SHN utilizado em alguns experimentos, foi previamente adsorvido com os parasitos (*L. braziliensis* ou *L. infantum*), com o objetivo de retirar anticorpos

naturais que poderiam estar presentes, assegurando-se a não participação de anticorpos contra as promastigotas nos ensaios. Este procedimento foi realizado da seguinte maneira: a 200 μ L de SHN puro foram adicionados 50 μ L de parasitos na concentração de 1×10^9 /mL e incubados a 4°C durante 60 minutos. As suspensões foram então centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada (4°C). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e o procedimento repetido. O sobrenadante final foi separado do sedimento e utilizado nos experimentos.

3.2.4 ENSAIO DE ADESÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A PROMASTIGOTAS DA *L. braziliensis* POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Formas promastigotas vivas de *L. braziliensis* em fase estacionária de crescimento foram lavadas três vezes em TBS-Ca e a concentração ajustada para 1×10^7 células/mL em TBS-Ca. Em seguida, os parasitos foram incubados com 30% de SHN e 1000 ng/mL de MBL, CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 recombinantes em TBS-Ca com 1% de albumina bovina (BSA) *overnight* a 4°C. Subsequentemente, os parasitos foram lavados duas vezes em TBS-Ca e incubados com os seguintes anticorpos primários: monoclonal anti-MBL (BioPorto, Gentofte, Denmark), policlonal anti-CL-11 (Novus Biologicals, Littleton, USA), policlonal anti-ficolina-1 (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands), monoclonal anti-ficolina-2 (BioPorto, Gentofte, Denmark) e policlonal anti-ficolina-3 (Cloud-Clone corp, Houston, TX, USA) em TBS-Ca com 1% BSA, por 60 minutos a 4°C. Na sequência, as promastigotas foram lavadas duas vezes em TBS-Ca e incubadas com os anticorpos secundários: anti-IgG de coelho conjugada com Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) ou anti-IgG de camundongo conjugada com fluoresceína (Cappel, Solon, USA), em TBS-Ca com 1% BSA, por 60 minutos, a 4°C. Finalmente, os parasitos foram lavados duas vezes em TBS-Ca e mantidos em 50 μ L de suspensão, alíquotas foram colocadas entre lâmina e lamínula. Imagens de todos os experimentos foram obtidas em microscópio confocal Nis Elements 4.20 (*laser scanning microscope*, A1 MP +, *head mounted on an inverted microscope* ECLIPSE Ti-E [NIKON Instruments Inc., Tóquio, Japão]) com aumento de 600x e analisadas com o auxílio do Nikkon *offline software* Nis Elements 4.20 *Advanced Research*.

O controle negativo deste experimento foi realizado na ausência de SHN e de proteínas recombinantes; como controle positivo utilizamos marcação com MBL, sendo os parasitos submetidos à mesma sequência de reação descrita acima. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

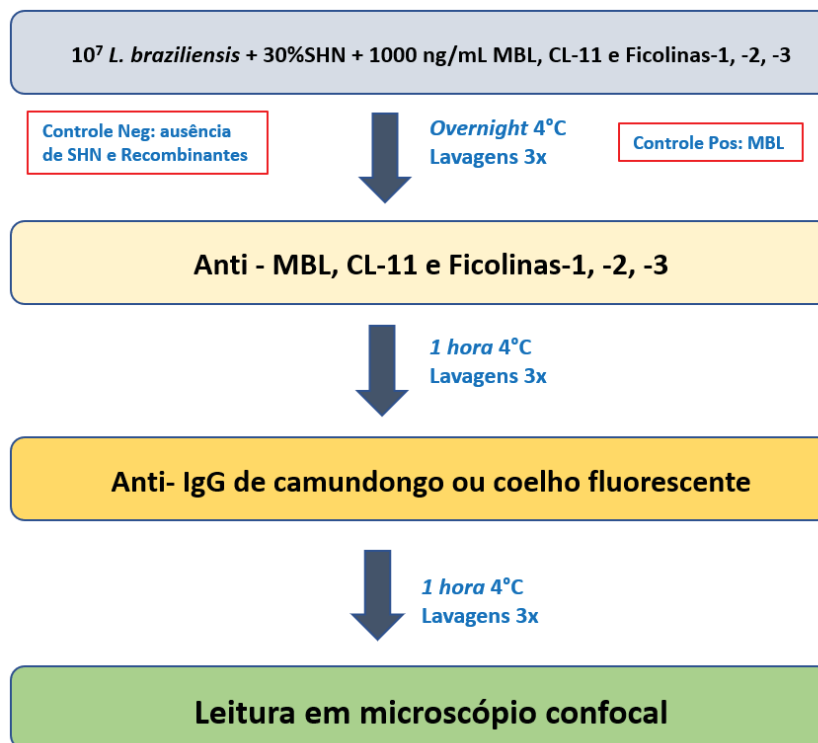


Fig. 20 Fluxograma do ensaio de adesão das proteínas séricas e recombinantes a *L. braziliensis*.

3.2.5 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES A *L. braziliensis* POR CARBOIDRATOS

Para identificar a influência de carboidratos na adesão de proteínas recombinantes a *L. braziliensis*, antes de realizar o ensaio de ligação, 1000 ng/mL de cada proteína (MBL, CL-11 e Ficolinas-1, -2, -3) em TBS-Ca com 1% BSA foram incubadas com 20 mg/mL do polissacarídeo manana (Sigma Aldrich), 50 mM dos monossacarídeos D-galactose (Sigma Aldrich) e N-acetil-D-glucosamina (Merck Sharp & Dohme) por 60 minutos a 4°C (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005). Na sequência, a *L. braziliensis* foi incubada com as proteínas recombinantes tratadas com os açúcares, conforme procedimento 6.2.4. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

3.2.6 ENSAIO DE ADESÃO E QUANTIFICAÇÃO DA LIGAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A PROMASTIGOTAS DA *L. braziliensis* E *L. infantum* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Promastigotas vivas de *L. braziliensis* e *L. infantum* em fase estacionária de crescimento foram lavadas três vezes em TBS-Ca. A concentração foi ajustada para 1×10^7 células/mL em TBS-Ca. Em seguida, os parasitos foram incubados com 1, 5, 10 e 20% de SHN e 1000 (*L. braziliensis*) e 2000 (*L. infantum*) ng/mL de MBL, CL-11 e Ficolinas-1, -2, -3 recombinantes em TBS-Ca com 1% BSA *overnight* a 4°C. Em seguida, foram inativados em TBS-Ca com 2% de paraformaldeído por 30 minutos, a 4°C. Subsequentemente, os parasitos foram lavados por duas vezes em TBS-Ca e incubados com os seguintes anticorpos primários: monoclonal anti-MBL (BioPorto, Gentofte, Denmark), policlonal anti-CL-11 (Novus Biologicals, Littleton, USA), policlonal anti-ficolina-1 (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands), monoclonal anti-ficolina-2 (BioPorto, Gentofte, Denmark) e policlonal anti-ficolina-3 (Cloud-Clone corp, Houston, TX, USA) em TBS-Ca com 1% BSA, por 60 minutos a 4°C. Na sequência, as promastigotas foram lavadas duas vezes em TBS-Ca e incubadas com os anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou camundongo conjugados com Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) em TBS-Ca 1% BSA, por 60 minutos, a 4°C. Finalmente, os parasitos foram lavados por duas vezes em TBS-Ca e mantidos em 200 µL de suspensão, avaliados por citômetro de fluxo BD FACSCanto II *machine* (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) e analisadas no *software* FlowJo (Becton-Dickinson, Ashland, OR, USA). O controle negativo deste experimento foi realizado na ausência de SHN e de proteínas recombinantes, como controle positivo utilizamos a marcação com MBL, sendo os parasitos submetidos à mesma sequência de reação descrita acima. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes, sendo avaliados 20.000 parasitos, em cada análise.

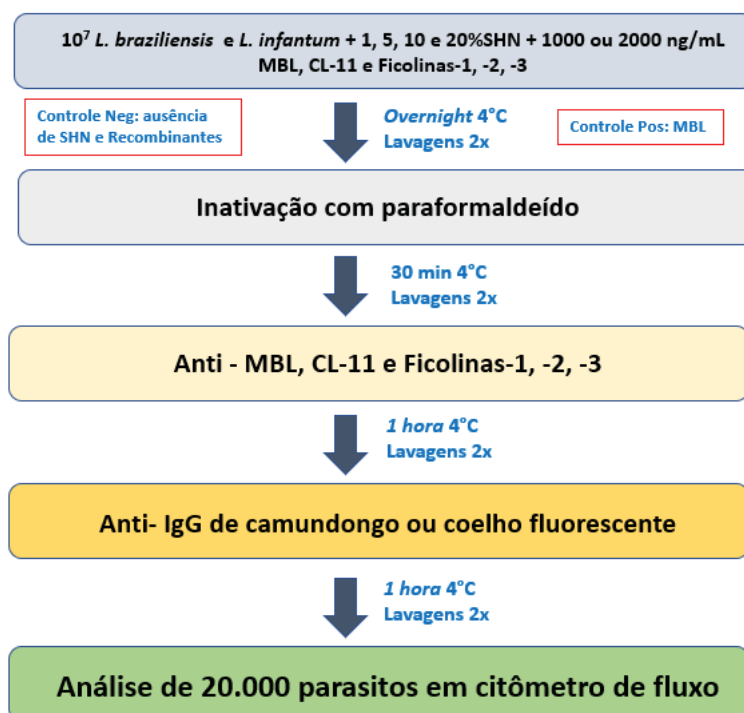


Fig. 21 Fluxograma do ensaio de quantificação da adesão das proteínas séricas e recombinantes a *L. braziliensis* e *L. infantum*.

3.2.7 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ADESÃO DE CL-11 E FICOLINAS-1, -2, -3 A *L. braziliensis* POR CARBOIDRATO

Para identificar a influência do carboidrato N-acetil-D-glucosamina na adesão das proteínas CL-11 e ficolinas-1, -2, -3 a *L. braziliensis*, antes de realizar o ensaio de ligação com 20% de SHN em TBS-Ca com 1% BSA, o mesmo foi incubado com 50 mM do monossacarídeo N-acetil-D-glucosamina (Merck Sharp & Dohme) por 60 minutos a 4°C (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005). Na sequência, a *L. braziliensis* foi incubada com o SHN tratado com N-acetil-D-glucosamina conforme procedimento 6.2.6 e avaliados para CL-11 e Ficolinas-1, -2, -3, por citometria de fluxo. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes.

3.2.8 ENSAIO DE ADESÃO DAS PROTEÍNAS DA VIA DAS LECTINAS SÉRICAS E RECOMBINANTES A PROMASTIGOTAS DA *L. infantum* POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Para demonstração da adesão das proteínas da via das lectinas a *L. infantum* por microscopia confocal, promastigotas submetidas ao ensaio de citometria de fluxo (item 6.2.6), foram aderidas a lâminas tratadas com solução de poli-L-lisina, coradas com o corante de DNA Hoescht, lavadas e montadas com lamínula e propilgalato. Finalmente, foram obtidas imagens no microscópio confocal Nis *Elements 4.20 (laser scanning microscope, A1 MP +, head mounted on an inverted microscope ECLIPSE Ti-E* [NIKON Instruments Inc., Tóquio, Japão]) com aumento de 600x e avaliadas com o *software* Nikon *offline Nis Elements 4.20 Advanced Research*.

3.2.9 DETECÇÃO DA DEPOSIÇÃO DE C4 E C3 NA SUPERFÍCIE DA *L. infantum* POR CITOMETRIA DE FLUXO

Formas promastigotas vivas da *L. infantum* em fase estacionária de crescimento foram lavadas três vezes em TBS-Ca e a concentração ajustada para $1,0 \times 10^7$ células/mL. Em seguida, foram incubadas por 45 minutos a 37°C, com as seguintes soluções a 10% em TBS-Ca: SHN adsorvido, SHN-EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) 100 mM e SHN inativado. Na sequência, os parasitos foram fixados em TBS-Ca com 2% de paraformaldeído por 30 minutos a 4°C, e lavados três vezes com TBS-Ca. Em seguida, foram suspensas em anticorpos policlonais anti-C3c humano (DAKO, Glostrup, Denmark) ou anti-C4c humano (DAKO, Glostrup, Denmark) conjugados com fluoresceína em TBS-Ca e incubados por 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, os parasitos foram lavados duas vezes em TBS-Ca, suspensos em 200 µl de TBS-Ca, avaliados em citômetro de fluxo BD FACSCanto II *machine* (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) e analisados com *software* FlowJo (Becton-Dickinson, Ashland, OR, USA). O controle deste experimento foi realizado na ausência de SHN, sendo os parasitos submetidos à mesma sequência de reações descritas acima. Este experimento foi realizado em duplicata e repetido três vezes. Foram avaliados 20.000 promastigotas, em cada análise.

3.2.10 ENSAIO LÍTICO POR COMPLEMENTO

O efeito lítico do complemento em promastigotas de *L. infantum* foi avaliado por meio da detecção de células que exibem complexidade intracelular reduzida, por meio de microscopia eletrônica de transmissão. Promastigotas de *L. infantum* (1×10^9 cels) foram lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubados com 0, 10 ou 20% de SHN em PBS por 30 min a 37°C. Depois foram lavadas duas vezes em PBS e o pellet de células resultante foi suspenso em solução fixadora de Karnovsky (tampão cacodilato de sódio 0,1 M, glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4%) por 60 min. Em seguida, as promastigotas foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio e tratadas com tetróxido de ósmio diluído 1:1 em ferrocianeto por 45 min. Posteriormente, foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio e desidratados em acetona. Depois foram infiltrados e incluídos em resina epóxi. Finalmente, os parasitas foram submetidos a um corte ultrafino, transferidos para grades de cobre (EMS - G300) e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, então fotografados a 100 kV com um JEOL JEM-1400 PLUS (Japan Electron Optics Laboratories, Peabody, Massachusetts).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste trabalho, os dados foram expressos como média e desvio padrão dos experimentos independentes e foram analisados usando o teste de Mann Whitney ou Kruskal-Wallis, com a comparação múltipla de Dunn como pós-teste.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO – 1

Publicado no periódico *Acta tropica* (Qualis A1/Fator de impacto 2,555), 2020.



Novel findings on the role of ficolins and colectins in the innate response against *Leishmania braziliensis*

Altair Rogerio Ambrosio^{a,b,*}, Lorena Bavia^a, Beatriz Santana Borges^c, Priscila Mazzocchi Hiraiwa^d, João Luis Machado Pietsch^e, Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro^c, Fabiano Borges Figueiredo^c, Lara Jose Messias-Reason^a

^a Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

^b Medical Department, Positivo University, Curitiba, Brazil

^c Cellular Biology Laboratory, Carlos Chagas Institute (ICC/Fiocruz), Curitiba, Brazil

^d Carlos Chagas Institute (ICC/Fiocruz), Curitiba, Brazil

^e Laboratory of Molecular Parasitology, Department of Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Leishmania (Viannia) braziliensis

Complement system

Lectin pathway

Ficolins

Colectins

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main agent of mucocutaneous Leishmaniasis, a neglected tropical disease that affects thousands of people in Brazil. It has been shown that complement plays a critical role at early stages of *Leishmania* infection and that is involved in the invasion of macrophages by the promastigotes. Ficolins and colectins are soluble pattern recognition and triggering molecules of the lectin complement pathway. We investigated here whether lectin pathway activators ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3 and CL-11 bind to live *L. braziliensis* promastigotes *in vitro*. Promastigote forms in the stationary growth phase were incubated with normal human serum (NHS) or recombinant ficolins 1, 2 and 3, MBL and CL-11, and protein binding was evaluated by confocal microscopy and flow cytometry. Ficolins 1, 2 and 3, MBL and CL-11 were able to bind to the surface of live promastigotes after incubation with either NHS or recombinant proteins. A partial inhibition by N-acetyl-D-glucosamine characterizing the participation of acetylated groups in the deposition of ficolins and CL-11 to glycoconjugates on the surface of *L. braziliensis* was observed. These evidences highlight a role for the lectin pathway in the innate response to *L. braziliensis*.

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected parasitic disease that occurs endemically in more than 80 countries throughout Africa, Asia, southern Europe and Latin America (Ameen, 2010). The disease comprises several clinical forms which are dependent on the parasite species as well as on immunological and genetic factors of the host. *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. braziliensis*), the causative agent of mucocutaneous leishmaniasis, is considered a major public health problem in Brazil. The clinical expression of *L. braziliensis* infection includes localized cutaneous, mucosal and disseminated leishmaniasis as well as atypical forms such as verrucous lesions or multiple nodular lesions in specific body areas (Guimarães et al., 2009). The parasite is transmitted during the blood meal of infected female sandflies that inoculate metacyclic promastigote forms, which are infectious to the host vertebrate. Promastigotes are phagocytosed and differentiate into amastigotes inside macrophages of various tissues. The cycle is completed when

amastigotes transform into promastigotes forms in the sandfly gut going through the stages of procyclic, nectomonad, leptomonad, hap tomonad until metacyclic promastigotes which are regurgitated from the anterior midgut of the insect to the host skin (Bates and Rogers, 2004).

Complement is a sophisticated host defense system designed to eliminate pathogens. It consists of more than 35 serum and membrane associated proteins, which play an important role against microbial infections. The activation of complement system comprises three pathways: classical, lectin and alternative. The lectin pathway is initiated when pattern-recognition molecules (PRMs) including mannose binding lectin (MBL), collectin-11 (CL-11), and ficolins (Ameen, 2010; Guimarães et al., 2009; Bates and Rogers, 2004) bind to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). After binding to the targets, the complement cascade leads to C3 cleavage into C3a and C3b, being the last one important in the opsonization and phagocytosis of intracellular parasites. In the sequence, C5 is cleaved in C5a and in C5b, which lead

* Corresponding author.

E-mail address: altairambrosio@gmail.com (A.R. Ambrosio).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105673>

Received 7 May 2020; Received in revised form 18 August 2020; Accepted 18 August 2020

Available online 19 August 2020

0001-706X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

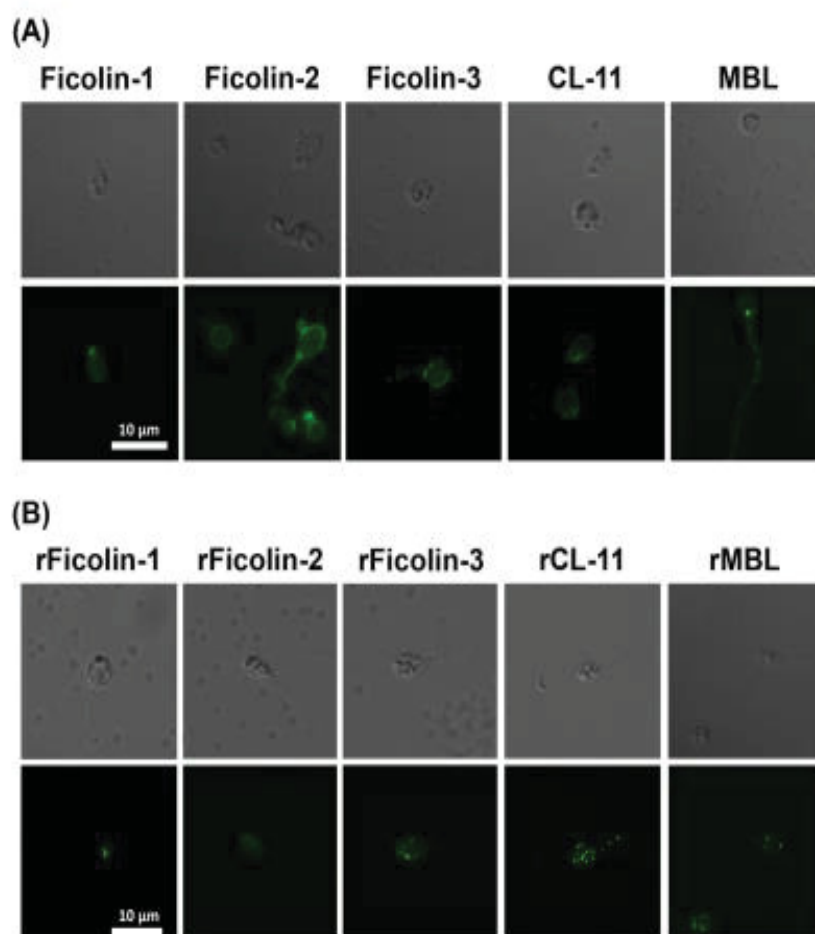


Fig. 1. Fluorescent confocal microscopy showing the deposition of ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3, CL-11 and MBL on *L. braziliensis* promastigote surface. The parasites were first exposed to NHS (A) or recombinant proteins (B), then incubated with monoclonal or polyclonal anti-CL-11, anti-ficolin-1, anti-ficolin-2, anti-ficolin-3 and anti-MBL antibodies, and after that with anti-mouse-IgG fluorescein conjugated or anti-rabbit-IgG Alexa 488 conjugated. This experiment was repeated three times. Multiple images from all experiments were taken by confocal microscopy (Nikon Instruments Inc.) at 600x magnification and evaluated with Nikon offline software Nis Elements 4.20 Advanced Research.

to the formation of the terminal membrane attack complex (C5b-9) that lysis target microorganisms (Garred et al., 2016; Beltrame et al., 2014).

Complement has been shown to play a critical role at early stages of *Leishmania* infection (Mosser et al., 1992). When the promastigotes are inoculated into mammalian hosts, they are exposed to complement, which either lead to lysis or phagocytosis of the parasites. At this stage the parasite may be covered by complement fragments such as C3b and C3bi, which mediate phagocytosis by complement receptors CR1 or CR3 on macrophages (Wilson and Pearson, 1988; Da Silva et al., 1989). Thus, complement activation and complement receptors are important devices used by promastigotes to invade phagocytic cells. In fact, *in vitro* studies showed that *Leishmania* parasites fail to bind to macrophages in the absence of complement (Mosser et al., 1992). In this context, PRMs that lead to complement activation may be important to determine the fate of *L. braziliensis* infection during the early response to the parasite. Few studies have reported the interaction of the lectin pathway proteins with *Leishmania* and, so far only the binding of MBL to *L. braziliensis* has been described (Ambrosio and De Messias-Reason, 2005). In this study we show for the first time that ficolins and CL-11 also recognize PAMPs on the surface of live *L. braziliensis* promastigotes. Considering that ficolins, CL-11 and MBL have a central role in the activation of the lectin pathway, our results highlight the importance of complement lectin proteins in the innate response to *Leishmania* infection.

2. Materials and methods

2.1. Binding assays of the lectin complement proteins with *L. braziliensis*

The evaluation of PRMs deposition on *L. braziliensis* (strain MHOM/BR/75/M2904 in the fifth passage) promastigotes was performed qualitatively by confocal microscopy and quantitatively by flow cytometry assays. The NHS used in all experiments was obtained from a pool of 10 healthy volunteer donors with no history of leishmaniasis and negative immunofluorescence to the promastigotes. In order to remove possible antibodies to *Leishmania*, only for the confocal microscopy assay NHS was previously treated by two consecutive incubations with 1×10^9 promastigotes/mL for 60 min at 4 °C, followed by low speed centrifugation (1400 relative centrifugal force [RCF]) (NHS-ads). Live *L. braziliensis* (1×10^7) cells/mL from stationary growth phase were incubated with either 30% NHS-ads or 1000 ng of each recombinant protein [ficolin-2 and CL-11 (R&D Systems), ficolin-1, ficolin-3 and MBL (Cloud-Clone)] in tris-buffered saline with 10 mM CaCl_2 (TBS-Ca) and 1% BSA overnight at 4 °C. Subsequently, the promastigotes were washed two times in TBS-Ca at 4 °C and centrifuged at 1400 RCF followed by incubation for 60 min at 4 °C with primary antibodies as follow: mouse anti-human-MBL (BioPorto), rabbit anti-CL-11 (Novus Biologicals), rabbit anti-ficolin-1 (Hycult Biotech), mouse anti-ficolin-2 (BioPorto) or rabbit anti-ficolin-3 (Cloud-Clone), all diluted 1:600 in TBS-Ca with 1% BSA. After washing in TBS-Ca, the parasites were incubated with the secondary antibodies: anti-rabbit-IgG Alexa 488 conjugated (Thermo Fisher Scientific) or anti-mouse-IgG fluorescein conjugated (Cappel), diluted 1:600 in TBS-Ca 1% BSA for 60 min at 4 °C. Finally, the parasites were washed two times under the same

Table 1

Percentage of *L. braziliensis* labelled for the lectins proteins after interaction with NHS or recombinant proteins by flow cytometry.

	Ficolin-1	Ficolin-2	Ficolin-3	CL-11	MBL
Control	09.96 ± 0.21	10.60 ± 0.26	09.32 ± 0.58	10.14 ± 0.62	10.67 ± 0.32
NHS 1%	23.10 ± 0.52	19.13 ± 0.67	32.57 ± 1.70	5.007 ± 0.44	14.60 ± 0.10
NHS 5%	57.87 ± 1.38	20.73 ± 0.38	30.87 ± 0.50	7.763 ± 0.67	18.50 ± 0.26
NHS 10%	95.33 ± 0.90*	28.70 ± 0.46*	76.47 ± 2.55*	17.23 ± 0.71	21.40 ± 0.17*
NHS 20%	98.63 ± 0.31*	46.47 ± 1.40*	95.97 ± 1.19*	44.87 ± 1.35	34.80 ± 2.35*
Recombinant	43.00 ± 0.17	12.67 ± 0.93	12.93 ± 2.06	13.70 ± 0.46	11.50 ± 0.10

Note: All serum dilutions and recombinant proteins were compared with the negative control, by Kruskal Wallis test and Dunn's Multiple Comparison Test. The significant difference is represented as * when $p < 0.05$. Control experiments included the same methodology in the absence of NHS or recombinant proteins as negative control.

conditions and control samples were run in the absence of NHS or recombinant proteins. This experiment was repeated three times. Multiple images from all experiments were taken by laser scanning microscope (Nis Elements 4.20 Confocal microscopy A1 MP +, head mounted on an inverted microscope ECLIPSE Ti-E [NIKON Instruments Inc., Tokyo, Japan]) at 600x magnification and evaluated with Nikon offline software Nis Elements 4.20 Advanced Research.

The flow cytometry assay followed the same methodology used for confocal microscopy as described above, with the parasites being exposed to either 20, 10, 5 and 1% NHS or 1000 ng of each recombinant protein MBL, CL-11 and ficolins-1, -2, -3. After the incubation, a further step was included in the assay with the promastigotes being inactivated with 2% paraformaldehyde in TBS-Ca for 30 min at 4 °C. Following the washes, anti-mouse-IgG Alexa 488 conjugated (Thermo Fisher Scientific) was used as secondary antibody. The experiment were analyzed in a BD FACSCanto II machine (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) and FlowJo software (Becton-Dickinson, Ashland, OR, USA).

2.2. Inhibition by carbohydrate

In order to identify the participation of acetylated groups in the binding of ficolins and CL-11 to glycoconjugates of *L. braziliensis* promastigotes, 20% NHS in TBS-Ca and 1% BSA were preincubated with 50 mM of the monosaccharide N-acetyl-D-glucosamine (Merck Sharp & Dohme) for 60 min at 4 °C. Afterwards, carbohydrate pretreated NHS was incubated with *L. braziliensis* and evaluated for ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3 and CL-11 deposition by flow cytometry as described above.

3. Results and discussion

Deposition of ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3, CL-11 and MBL on the surface of *L. braziliensis* was observed in the presence of 30% NHS (Fig. 1a). The deposition of all PRMs occurred in both body and flagella of the parasites. The fluorescence was patchy, with greater intensity at the base of the flagella, with promastigotes showing morphological alterations (Fig. 1a). In the absence of NHS, no fluorescence signal or visible background was detected on the promastigote surfaces (data not shown). On the other hand, the immunofluorescence intensity with recombinant proteins was lower in comparison to NHS (Fig. 1b). This was probably due to the fact that recombinant proteins are mostly present in monomeric form, whereas in serum collectins and ficolins are assembled into trimers, tetramers or oligomeric forms and complexed with MASPs (MBL-associated serine proteases), which exhibit multiple recognition sites (Garred et al., 2016). Also, the possibility of proteins denaturation in the recombinant forms must be considered.

The results of flow cytometry assay were obtained using different tools: the number of labelled parasites to compare the binding affinity of the proteins and median fluorescence intensity (MFI) to characterize the partial inhibition of N-acetyl-D-glucosamine in the binding of ficolins and CL-11. This procedure was necessary since both monoclonal (MBL and ficolin-2) and polyclonal (ficolin-1, ficolin-3 and CL-11) were used as primary antibodies. Polyclonal antibodies are known to

generate greater fluorescence intensity and consequently higher MFI.

In the presence of increasing NHS concentrations, the number of labelled parasites augmented reaching maximum of detection at 20% NHS: with 98.6% of binding for ficolin-1, 95.9% for ficolin-3, 46.4% for ficolin-2, 44.8% for CL-11, and 34.8% for MBL (Table 1). Statistical significance was found for ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3 and MBL using both 10 and 20% NHS concentrations. Considering the percentage of labelled parasites, a major affinity for ficolin-1 and 3 deposition to *L. braziliensis* was observed (Table 1). This deposition was confirmed when purified proteins at concentration of 1000 ng/ml were used. The concentration of all recombinant proteins were within the normal range found in human serum (Garred et al., 2016; Endo et al., 2015; Garred et al., 2010).

When the MFI of the parasites was evaluated, a statistically significant increase in the fluorescence signal was observed at 10 and 20% NHS for ficolins and CL-11, and only at 20% NHS for MBL (Fig. 2). Thus, by using a different approach, findings corroborate the fact that all proteins ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3, CL-11 and MBL are able to bind to the surface of *L. braziliensis* promastigotes.

The inhibition assay using N-acetyl-D-glucosamine prevented partially the deposition of ficolins and CL-11 to *L. braziliensis* promastigotes with a reduction of 23% for ficolin-1 and 2, 21% for ficolin-3 and 22% for CL-11 evaluated by MFI index (Fig. 2a to d), $p = ns$. This finding suggests a role for acetylated carbohydrates in the binding of the lectin pathway proteins to *Leishmania* surface. Considering that both collectins and ficolins comprise a broad spectrum of ligands, and that the inhibition by N-acetyl-D-glucosamine was partial, it is possible that other carbohydrates or acetylated groups or a combination of them could be involved in the recognition and binding of *L. braziliensis* by ficolins and CL-11. Moreover, the binding complexity of these proteins to the different ligands and microorganisms depends on carbohydrate-recognition domain (CRD) sites of each molecule, with ficolin-2 presenting four CRD sites, whereas ficolin-1 and ficolin-3 only one each (Matsushita et al., 1996; Honoré et al., 2010).

It is known that MBL by itself can promote the opsonization of microorganisms, intensifying their attachment to phagocytic cells (Kuhlman et al., 1989). Likewise, ficolin-2 acts as an opsonin enhancing the phagocytosis of *S. typhimurium* by neutrophils (Matsushita et al., 1996). Considering that *L. braziliensis* is an intracellular pathogen and phagocytosis is essential for the establishment of infection, ficolins, MBL and CL-11 binding to *L. braziliensis* could provide an additional uptake mechanism of the parasites by phagocytic cells, specially ficolin-1 which showed higher affinity for *L. braziliensis* and is also expressed on phagocytic cell membrane (Honoré et al., 2010). Similarly to ficolin-1, ficolin-3 showed high affinity binding to *L. braziliensis* and differently from ficolin-1 that is expressed on phagocytic cells and found soluble in plasma, ficolin-3 is only present in plasma. Considering that granulocytes and macrophages are the first cells in tissue to meet *L. braziliensis* during the sandfly bite, and that ficolin-1 is expressed on these cells surface, ficolin-1 although present in low levels in serum (around 0.3 µg/ml) (Liu et al., 2005), might be important in the early stage of this infection. Another possibility that may be considered is a synergism

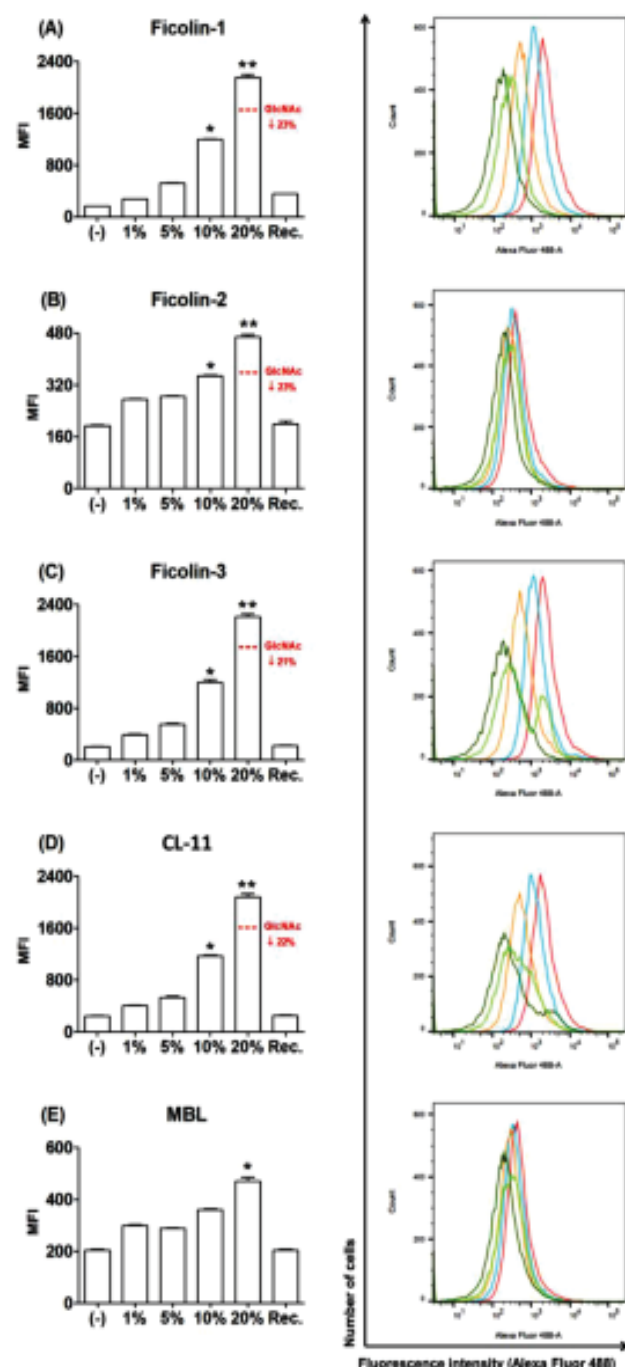


Fig. 2. Quantitative deposition of lectins from complement pathway on *L. braziliensis*. Promastigotes were incubated with 0, 1, 5, 10, 20% NHS and 20% NHS pretreated with N-acetyl-D-glucosamine and detected with monoclonal or polyclonal (anti-ficolin-1, anti-ficolin-2, anti-ficolin-3, anti-CL-11 or anti-MBL) antibodies, followed by incubation with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488. Firstly, promastigote parasites were characterized by their size (FSC, forward scatter) and granularity (SSC, side scatter) and the median fluorescence intensity (MFI) for ficolin-1 (A), ficolin-2 (B), ficolin-3 (C), CL-11 (D) and MBL (E) was obtained. A total of 20,000 cells were evaluated. The red line at 20% NHS sample in bar graphics represents the inhibition caused by N-acetyl-D-glucosamine, $p = ns$ (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison posttest). The bar graphics (left) represents the mean and standard deviation from three independent experiments. The histograms (right) show a representative result from each condition: 0% NHS (black), 1% NHS (green), 5% NHS (orange), 10% NHS (blue) and 20% NHS (red). All serum dilutions were compared with the negative control (-) by Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparison as posttest (** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$). Negative controls

included absence of NHS or recombinant proteins.

of all the PRMs, specially ficolin-1 and ficolin-3, in the first steps of host defense after the promastigotes inoculation. Nevertheless, the presence of complement inhibitors in the saliva of *L. longipalpis* has been also observed which may participate in promastigotes protection at the bite site (Mendes-Sousa et al., 2013). Therefore, the result of these interaction will help to determine the fate of the infection.

A broader range of carbohydrates should be tested in future studies in order to identify the components and/or specific structures on *L. braziliensis* surface that are the target for the lectin pathway proteins. Also, the identification of receptors and structures involved in the internalization and processing of *Leishmania* by macrophages should be further investigated. In this context, the participation of complement system and particularly of the lectin pathway, is of great interest in order to unveil the underlying mechanisms in the development of leishmaniasis.

4. Conclusion

In this study we show for the first time that the initiator proteins of the lectin pathway (ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3 and CL-11), interact with infective promastigotes of *L. braziliensis* and thereby could lead to complement activation. Further investigation is required to characterize the participation of ficolins and collectins in the first steps of host defense against *L. braziliensis*.

Author contributions

ARA and LB: study conception, design, performed the experiments, analyzed the data and manuscript writing; BSB and JLMP parasite maintenance and manuscript review; PMH analyzed the data and manuscript review; MCVC: study design, analyzed the data and manuscript review; LJMR and FBF: study conception, design and manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by Fundação Araucária (PPSUS-01/2016) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). L. Bavia was the recipient of a junior postdoctoral fellowship from CNPq (420,553/2017-7). Fabiano Borges Figueiredo and Iara J. M. Reason hold grants from CNPq for productivity in research.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

We would like to thank the CTAF (Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência), CAPES (Edital Pró-equipamentos), FINEP (Edital Pró-Infra 2009 [CT-INFRA]) and Israel Henrique Bini for the helpful assistance in confocal microscopy. We also thanks to FIOCRUZ Network of Technological Platforms for access Flow Cytometry facility (RPT08L) at Carlos Chagas Institute-Fiocruz/PR.

References

- Ambrosio, A.R., De Messias-Reason, L.J., 2005. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. *Parasite Immunol.* 27 (9),

- 333–340.
- Ameen, M., 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clin. Exp. Dermatol.* 35 (7), 699–705.
- Bates, P.A., Rogers, M.E., 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4 (6), 601–609.
- Beltrame, M.H., Catarino, S.J., Goeldner, I., Boldt, A.B., de Messias-Reason, I.J., 2014. The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. *Front. Pediatr.* 2, 148.
- Da Silva, R.P., Hall, B.F., Joiner, K.A., Sacks, D.L., 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J. Immunol.* 143 (2), 617–622.
- Endo, Y., Matsushita, M., Fujita, T., 2015. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 316, 49–110.
- Garred, P., Genster, N., Pilely, K., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Ma, Y.J., et al., 2016. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunol. Rev.* 274 (1), 74–97.
- Garred, P., Honoré, C., Ma, Y.J., Rørvig, S., Cowland, J., Boerregaard, N., et al., 2010. The genetics of ficolins. *J. Innate. Immun.* 2 (1), 3–16.
- Guimarães, L.H., Machado, P.R., Lago, E.L., Morgan, D.J., Schrieffer, A., Bacellar, O., et al., 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103 (7), 712–715.
- Honoré, C., Rørvig, S., Hummelshøj, T., Skjold, M.O., Boerregaard, N., Garred, P., 2010. Tethering of Ficolin-1 to cell surfaces through recognition of sialic acid by the fibrinogen-like domain. *J. Leukoc. Biol.* 88 (1), 145–158.
- Kuhlman, M., Joiner, K., Ezekowitz, R.A., 1989. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. *J. Exp. Med.* 169 (5), 1733–1745.
- Liu, Y., Endo, Y., Iwaki, D., Nakata, M., Matsushita, M., Wada, I., et al., 2005. Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. *J. Immunol.* 175 (5), 3150–3156.
- Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., et al., 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* 271 (5), 2448–2454.
- Mendes-Sousa, A.F., Nascimento, A.A., Queiroz, D.C., Vale, V.F., Fujiwara, R.T., Araújo, R.N., et al., 2013. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* promastigotes. *PLoS ONE* 8 (11), e79787.
- Mosser, D.M., Springer, T.A., Diamond, M.S., 1992. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Cell Biol.* 116 (2), 511–520.
- Wilson, M.E., Pearson, R.D., 1988. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 56 (2), 363–369.

4.2 ARTIGO – 2

Submetido ao periódico *Parasite* (Qualis A1/Fator de impacto 2,050), 2020.

The lectin pathway of complement and the initial recognition of *Leishmania infantum* promastigotes

Altair Rogerio Ambrosio,^{1,2,#} Lorena Bavia,^{1#} Priscila Mazzocchi Hiraiwa,³ Thais Cristina Tirado,⁴ Fabiano Borges Figueiredo^{4&} and Lara Jose Messias-Reason^{1&}

¹ Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba Post code 80060-900, Brazil.

² Department of Medicine, Positivo University, Curitiba Post code 81280-330, Brazil.

³ Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ-PR, Curitiba Post code 81310-020, Brazil.

⁴ Cellular Biology Laboratory, Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ-PR, Curitiba Post code 81310-020, Brazil.

These authors contributed equally to this work.

& These authors share senior authorship

Correspondence should be addressed to Altair R. Ambrosio:

altairambrosio@gmail.com

Abstract

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected and highly lethal disease that occurs endemically in Brazil. VL is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum*, transmitted by female phlebotomine sandflies. Immediately after the inoculation of *L. infantum* promastigotes into the vertebrate host, the complement, as part of the first line of innate response, becomes activated. *L. infantum* promastigotes glycocalyx is rich in carbohydrates that can activate the lectin pathway. In this study, we evaluated whether the lectin pathway collectins [manose binding lectin (MBL) and CL-11] and ficolins (-1, -2 and -3) interact with *L. infantum* promastigotes, using confocal microscopy and flow cytometry. The binding of MBL, CL-11 and ficolins -1 and -3, but not ficolin-2, was observed on the surface of promastigotes after incubation with NHS or recombinant proteins. C3 and C4 deposition as well as complement mediated lyses was also demonstrated after interaction with NHS. These results highlight a role for collectins and ficolins in the initial immune response to *L. infantum*.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) infantum*; complement system; lectin pathway; ficolins; collectins.

Introduction

Leishmaniasis is a poverty-related neglected disease with estimated 0.7-1 million new cases reported annually, in nearly 100 endemic countries. It occurs in 12 countries of the American continent, with Brazil being responsible for 96% of the cases [1]. Visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* (syn. *chagasi*), is considered a public health problem in Brazil [1]. VL is a vector-borne disease transmitted by the bite of infected *Lutzomyia longipalpis* female. During blood meals, the phlebotomine inoculates metacyclic promastigotes into the skin of vertebrate hosts. The protozoa can actively invade phagocytic cells, with promastigotes differentiating into amastigotes, multiplying in various tissues and infecting other cells [2].

Immediately after inoculation of *L. infantum* into the vertebrate host, the complement system is among the components of innate response that may lead to the destruction of promastigotes [3]. The complement is composed of more than 35 proteins and can be activated by three pathways. The classical, alternative and lectin pathways. The lectin pathway becomes activated after

binding of soluble pattern recognition molecules (PRM) as mannose binding lectin (MBL), collectin-11 (CL-11) and ficolins (-1, -2 and -3) to carbohydrates or acetylated compounds on pathogen surfaces [4]. The participation of complement in the early phase of *Leishmania* infection has been demonstrated by experimental [5] as well as “in vitro” studies [6-10], and a role for the lectin pathway in *L. infantum* infection has been also reported. MBL was shown to interact with *L. infantum* surface and high serum levels of MBL increased the susceptibility to VL and modulated the function of infected macrophages, contributing to the clinical outcome of the infection [10]. Moreover, studies on *MBL2* gene polymorphisms showed that genotypes associated with high MBL levels were related to symptomatic VL caused by *L. infantum* [11, 12]. On the other hand, polymorphisms in the promoter -221 region of *MBL2* gene were associated with protection against *L. infantum* in patients from Morocco [13]. In addition, higher levels of ficolin-2 and the + 6359C> T (*p.T236M*) *FCN2* gene structural variant were both associated to VL caused by *Leishmania donovani* in India [14]. Considering the importance of the lectin pathway initiators in the context of infection by different species of leishmania, and that there are no reports whether ficolins and collectin-11 interact with the parasite, we aimed in this study to evaluate the binding of these proteins to surface of *L. infantum* promastigotes and to further characterize the activation of complement by the parasite.

Materials and Methods

Adhesion assays of the complement proteins to *L. infantum* surface

The qualitative and quantitative adhesion of PRMs to *L. infantum* (strain MHOM/BR/1974/PP75) in stationary growth phase promastigotes was performed using confocal microscopy and flow cytometry assays. As source of human proteins, a pool of fresh NHS collected from 10 healthy volunteer donors with no history of leishmaniasis and negative immunofluorescence for promastigotes was used. In order to remove possible natural antibodies to *Leishmania*, the NHS pool, was adsorbed by two consecutive incubations with 1×10^9 promastigotes/mL for 60 min at 4°C, followed by centrifugation at low speed (1400 relative centrifugal force [RCF]) (NHS-ads), prior being used in the complement assays. The NHS was also treated with 100 mM

ethylenediaminetetraacetic acid (NHS-EDTA) to prevent complement activation and heat inactivated at 56°C for 30 minutes (NHS-HI). The human recombinant proteins ficolin-2 and CL-11 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), ficolin-1, ficolin-3 and MBL (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA) were used in all binding assays. Live *L. infantum* (1×10^7) cells/mL were washed three times in tris-buffered saline with 10 mM CaCl_2 (TBS-Ca) at 4°C and incubated with 1, 5, 10 or 20% NHS or 2000 ng/mL of recombinant proteins in TBS-Ca with 1% BSA overnight at 4°C. Following, the parasites were treated with 2% paraformaldehyde in TBS-Ca for 30 min at 4°C in order to inactivate the promastigotes. Subsequently, they were washed two times in TBS-Ca, centrifugated at 1400 RCF and incubated for 60 min at 4°C with either monoclonal anti-human-MBL (BioPorto, Gentofte, Denmark), polyclonal anti-CL-11 (Novus Biologicals, Littleton, USA), polyclonal anti-ficolin-1 (Hycult Biotech, Uden, The Netherlands), monoclonal anti-ficolin-2 (BioPorto, Gentofte, Denmark) and polyclonal anti-ficolin-3 (Cloud-Clone corp, Houston, TX, USA) in TBS-Ca with 1% BSA, as primary antibodies. After washing in TBS-Ca, the parasites were incubated with the secondary antibodies anti-rabbit-IgG Alexa 488 conjugated (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) or anti-mouse-IgG Alexa 488 conjugated (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) in TBS-Ca 1% BSA for 60 min at 4°C. Finally, the promastigotes were washed two times in TBS-Ca, resuspended in 200 μL of TBS-Ca and evaluated by flow cytometry and confocal microscopy. Control samples included primary and secondary antibodies, but not NHS or recombinant proteins. This experiment was repeated three times and in flow cytometry assay a total of 20000 *L. infantum* were evaluated in each well. Binding of PRMs to the parasites was analyzed in a BD FACSCanto II machine (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA) and FlowJo software (Becton-Dickinson, Ashland, OR, USA), with both median fluorescence intensity (MFI) and percentage of labelled *L. infantum* being estimated.

For evaluating the protein binding by microscopy, the parasites followed the same treatment as described for flow cytometry, except that the parasites were only incubated with 20% NHS or recombinant proteins. This experiment was repeated three times. Multiple images from all experiments were taken by laser scanning microscope (Nis Elements 4.20 Confocal microscopy A1 MP +, head mounted on an inverted microscope ECLIPSE Ti-E [NIKON Instruments Inc.,

Tokyo, Japan]) at 600x magnification and evaluated with Nikkon offline software Nis Elements 4.20 Advanced Research.

Deposition of C3 and C4 on *L. infantum* surface

Live *L. infantum* promastigotes (1×10^7 cells/mL) from stationary growth phase were washed three times in TBS-Ca at 4°C and incubated with either 10% of NHS-ads, NHS-HI or NHS-EDTA in TBS-Ca with 1% BSA for 45 min at 37°C. Following, the promastigotes were inactivated with 2% paraformaldehyde in TBS-Ca for 30 min at 4°C. Subsequently, they were washed two times in TBS-Ca, centrifugated at 1400 RCF and incubated for 60 min at room temperature with polyclonal anti-human C3c fluorescein conjugated (DAKO, Glostrup, Denmark) or polyclonal anti-human C4c fluorescein conjugated (DAKO, Glostrup, Denmark) antibodies. Finally, parasites were washed two times in TBS-Ca, resuspended in 200 µL of TBS-Ca and evaluated by flow cytometry, as described above. Control samples were run in the absence of NHS. This experiment was repeated three times.

Lytic assay by complement

The lytic effect of complement on *L. infantum* promastigotes was evaluated by detection of cells exhibiting reduced intracellular complexity, using transmission electron microscopy (TEM). *L. infantum* promastigotes (1×10^9 cels) were washed two times in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated with either 0, 10 or 20% NHS in PBS for 30 min at 37°C. After they were washed two times in PBS and the resulting cell pellet was resuspended in fixative Karnovsky solution (0.1 M sodium cacodylate buffer, 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde) for 60 min. Following, promastigotes were washed three times in sodium cacodylate buffer and treated with osmium tetroxide diluted 1:1 in ferrocyanide for 45 min. Subsequently, they were washed three times in sodium cacodylate buffer and dehydrated in acetone. After they were infiltrated and embedded in epoxy resin. Finally, the parasites were subjected to ultrathin sectioning, transferred to copper grids (EMS - G300) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate, then imaged at 100 kV with a JEOL JEM-1400 PLUS (Japan Electron Optics Laboratories, Peabody, Massachusetts).

Results and Discussion

Adhesion of the lectin complement proteins to the *L. infantum* promastigotes

The proteins MBL, ficolin-1, ficolin-3 and CL-11 but not ficolin-2, were shown to bind to the surface of *L. infantum* promastigotes when exposed to 20% of NHS or recombinant proteins by confocal microscopy. The images showed PRMs deposition in both the body and flagella of the parasites, with nonuniform fluorescence pattern (**Figure 1**). In the absence of the proteins, no fluorescence signal was detected on the promastigote surfaces (data not shown). The intensity of fluorescence was higher when the parasites were incubated with NHS, instead of recombinant proteins. This was probably due to the fact that recombinant proteins are mostly present in monomeric form, whereas in serum collectins and ficolins are assembled into trimers, tetramers or oligomeric forms and complexed with MBL-associated serine proteases (MASPs), exhibiting multiple recognition sites. Also, the possibility of protein denaturation in the recombinant forms must be considered.

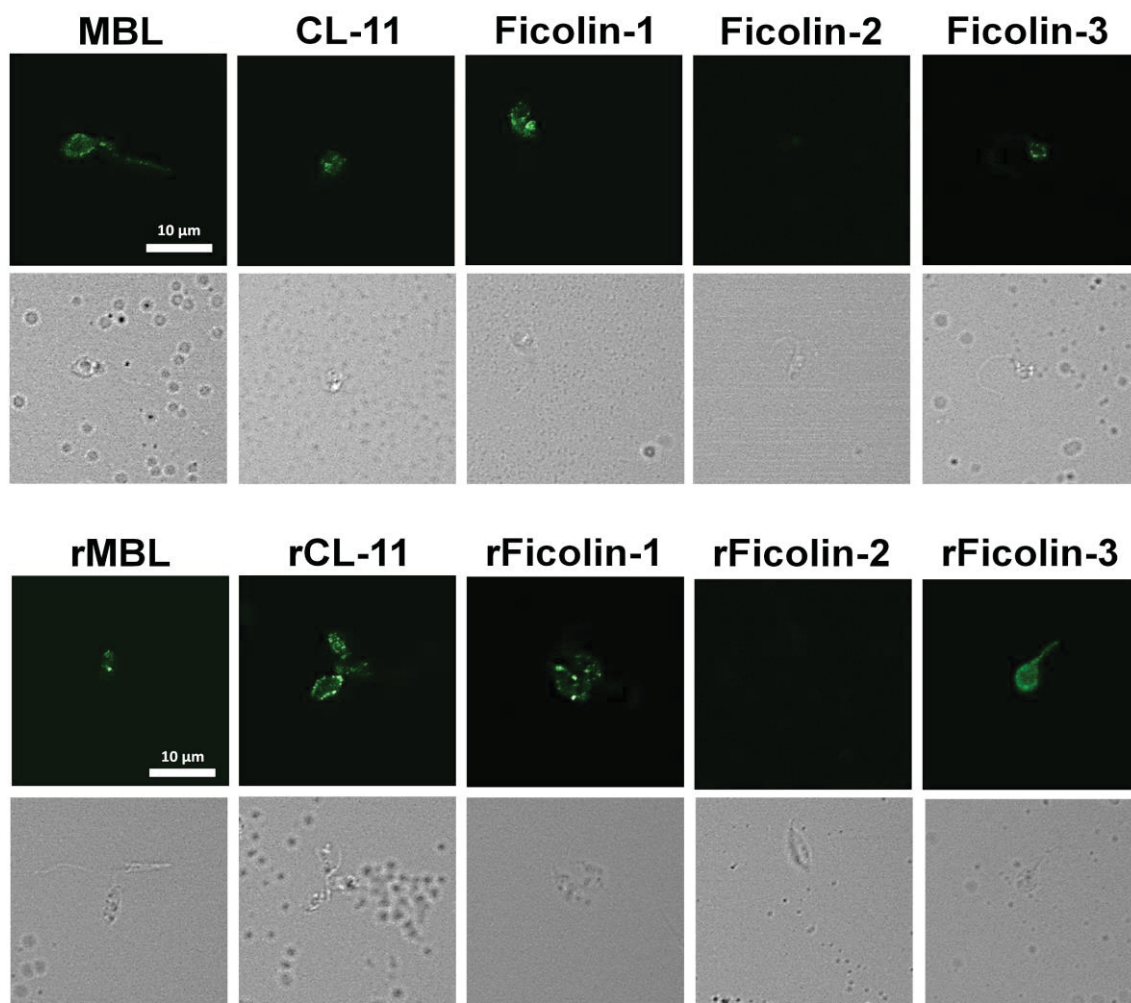


Figure 1: Adhesion of MBL, CL-11, ficolin-1, ficolin-2 and ficolin-3 to *L. infantum* promastigote surface by confocal microscopy. The parasites were first exposed to NHS (**upper panel**) or recombinant proteins (**lower panel**), incubated with monoclonal or polyclonal anti-MBL, anti-ficolin-1, anti-ficolin-2, anti-ficolin-3 and anti-CL-11 antibodies and after with anti-mouse-IgG Alexa 488 conjugated or anti-rabbit-IgG Alexa 488 conjugated.

The deposition of MBL, ficolin-1, ficolin-3, CL-11 on *L. infantum* surface after interaction with NHS was also observed by flow cytometry assay. Ficolin-2 was not detected. Similarly to the confocal microscopy assay, the labelling of parasites was lower when the promastigotes were incubated with recombinant proteins, instead of NHS. This must be due to the presence of monomeric forms and/or protein degradation in recombinant forms. The quantitative evaluation by flow cytometry used two different strategies, which included assessment of the median fluorescence intensity (MFI) from all parasites and the percentage of labelled parasites. This caution was necessary due to the use of being monoclonal and polyclonal primary antibodies, monoclonal for MBL and ficolin-2

and polyclonal for ficolin-1, ficolin-3 and CL-11. Since polyclonal antibodies are known to generate greater fluorescence intensity and consequently higher MFI, it was necessary to use also the percentage of labelled parasites. By increasing concentration of NHS (1, 5, 10 or 20%), there was a proportional increase in the MFI and in the number of labelled parasites for all lectin proteins (**Figure 2 and Table 1**), with highest proportion of labelled parasites being achieved with 20% of NHS. At this concentration, the range of the PRM's binding to the parasites were as follow: 69.5% for MBL, 52.9% for ficolin-1, 45.0% for ficolin-3, 43.4% for CL-11, and 16.7% for ficolin-2. The binding of MBL ($p<0,0001$) and ficolin-1 ($p<0,003$) were significantly higher when compared to ficolin-2 (**Table 1**).

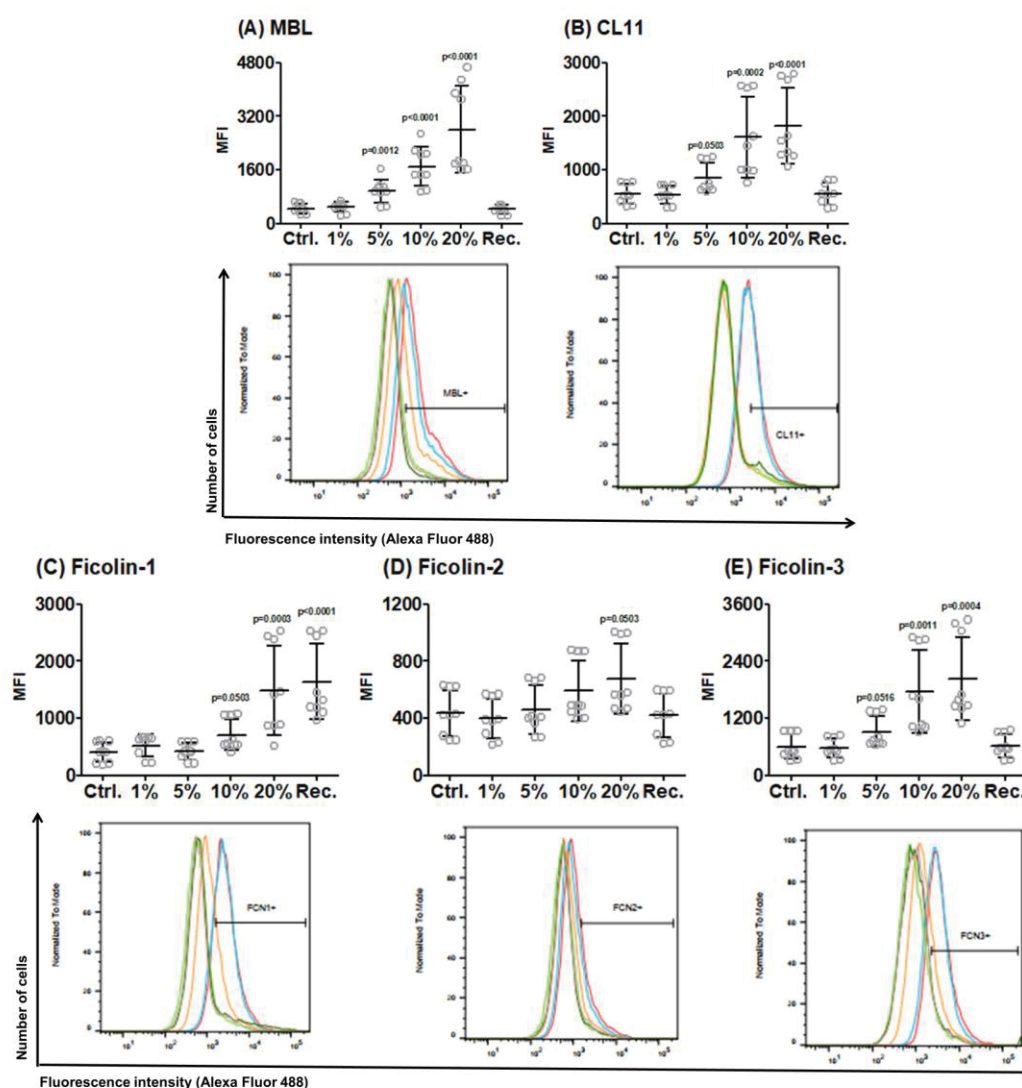


Figure 2: Deposition of MBL, CL-11 and ficolins on *L. infantum* surface. Parasites were incubated with 0, 1, 5, 10 or 20% NHS, or recombinant proteins, the deposition of the lectin pathway triggering proteins were detected with monoclonal or polyclonal anti-MBL, anti-CL-11, anti-ficolin-1, anti-ficolin-2 and

anti-ficolin-3 antibodies, followed by incubation with secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488. **Upper panel:** The median fluorescence intensity (MFI) for MBL (A), CL-11 (B), ficolin-1 (C), ficolin-2 (D) and ficolin-3 (E) was estimated on a FACS Canto II (Becton Dickinson). Data are expressed as mean and standard deviation of MFI from three independent experiments. All serum dilutions and recombinant proteins (Rec.) were compared with negative controls (Ctrl.) using Mann Whitney Test (A to E). The p values are presented in each graphic. **Lower panel:** The histograms show a representative result from each condition: 0% NHS (brown), 1% NHS (green), 5% NHS (orange), 10% NHS (blue) and 20% NHS (red).

Table 1: Percentage of labelled *L. infantum* promastigotes for the lectin pathway proteins.

	MBL	CL-11	Ficolin-1	Ficolin-2	Ficolin-3
Control	10.90 ± 01.13	14.82 ± 07.75	09.88 ± 01.37	10.45 ± 0.39	10.31 ± 0.52
SHN 1%	13.07 ± 07.48	13.92 ± 07.57	11.16 ± 07.05	08.80 ± 2.45	10.79 ± 03.33
SHN 5%	32.46 ± 13.60*	18.91 ± 13.66	19.83 ± 10.58*	10.25 ± 4.81	17.16 ± 05.83*
NHS 10%	50.53 ± 16.63*	38.81 ± 27.01*	47.59 ± 28.52*	13.75 ± 8.23	39.27 ± 21.41*
NHS 20%	69.48 ± 17.17*	43.40 ± 26.21*	52.86±28.88 ^a	16.68 ± 9.61 ^{ab}	44.96 ± 22.02*
Recombinant	09.07 ± 02.38	13.46 ± 05.59	22.20 ± 09.18*	09.61 ± 1.95	13.66 ± 03.64*

Note: All serum dilutions and recombinant proteins were compared with the negative control by Mann Whitney Test and the significant difference is represented * when $p < 0.05$. In addition, all 20% of NHS groups were compared using Kruskal Wallis test and Dunn's Multiple Comparison Test and the significant difference is represented as ^a vs MBL and ^b vs ficolin-1 when $p < 0.05$. The results represent the percentage of positive parasites by flow cytometry.

The binding of MBL, CL-11, ficolin-1 and -3 observed on *L. infantum* surface corroborates with the glycoinositolphospholipids (GIPL) and lipophosphoglycan (LPG) structure of the parasites. GIPLs are glycoconjugates known to be the major component of the parasite surface followed by LPG [15, 16]. It has been described that LPG have a relevant role during leishmania infection in the vertebrate host, being involved in processes such as: attachment and entry into macrophages, retardation of phagosome maturation, impairment in NADPH oxidase assembly, and induction of neutrophil extracellular traps [17]. GLIPs were shown also to modulate secretion of cytokine by macrophages, nitric oxide release and differential activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) (reviewed by Assis et. al. [17]). It's known that glycoconjugates structure

of promastigotes varies among leishmania species, thus a differential pattern of PRMs binding among *Leishmania* species is expected. While GIPL structure from *L. infantum* is composed mainly of mannose residues, GLIP from *L. braziliensis* is rich in galactose and mannose [17]. In addition, the structure of LPG from procyclic and metacyclic forms are different from each other and among *Leishmania* species. LPG from metacyclic *L. braziliensis* is rich in glucose side-chains associated with the repeat units of galactose and mannose [18]. On the other hand, there is a down-regulation of glucose side-chains during the metacyclogenesis of *L. infantum* which expose the repeat units of galactose and mannose [19]. Thus, the mannose present in GIPL [20] and LPG [19] could be recognized by MBL and CL-11 [4, 21], whereas the repeated units of galactose in LPG [19] could be the target for ficolins -1 and -3 [4, 21]. On the other hand, ficolin-2 is not able to bind to mannose, glucose, or galactose [22], unless these sugars become *N*-acetylated [23], which explains the low binding observed for this protein by *L. infantum*. Considering that our results indicate that serum MBL, CL-11, ficolin-1 and -3 are possibly able to bind to both LPG and GLIP, they could play a role in promoting host/parasite interaction, leading to important events such as phagocytosis and macrophage activation at the early stage of the infection. In fact it has been described that C3 increased phagocytosis and intracellular survival of *Leishmania major* [24]; and that CR1, the C3b receptor, mediates the binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages [25]. C3bi receptor (CR3) was also shown to participate in the attachment and ingestion of *L. donovani* promastigotes by human macrophages [26] and recently interaction of ficolin-2 with *L. braziliensis* was also reported [27].

Deposition of C3 and C4 on *L. infantum* surface

The deposition of C3 and C4 on *L. infantum* surface was evaluated by flow cytometry. and observed after interaction with 10% NHS. The results showed a significantly increase in the MFI for C3 (**Figure 3A**) and C4 (**Figure 3B**) when compared with controls $p < 0,05$. As expected, in the absence of NHS (Ctrl.) no deposition of C3 or C4 was observed on the parasite surface and an inhibition of 85.9% and 74.5% using NHS-EDTA or NHS-HI respectively. The deposition of C4 and C3 on the surface of *L. infantum* indicates that the activation of the cascade takes place, after interaction with NHS.

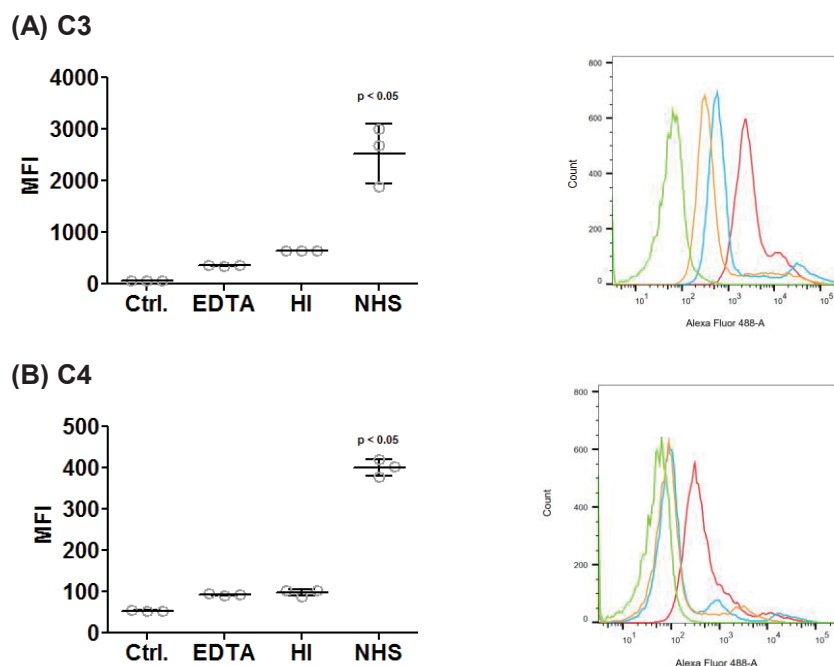


Figure 3: Deposition of complement C3 and C4 on promastigotes of *L. infantum*. Parasites were incubated with 10% NHS and fluorescein conjugated anti-C3 or anti-C4 antibodies. The interaction of C3 (A), and C4 (B) with *L. infantum* promastigotes was quantified by FACS Canto II (Becton Dickinson). As controls the parasites were incubated with no NHS (Ctrl.), 10% NHS-EDTA or NHS-HI. Data are expressed as mean and standard deviation from three independent experiments. The histograms show a representative result from each condition: control with no NHS (green), 10% NHS with EDTA (orange), heat inactivated 10% NHS (blue) and 10% NHS (red). Kruskal Wallis test and Dunn's Multiple Comparison Test were used for comparisons.

Complement Lytic assay

A lytic effect of complement on *L. infantum* promastigotes stationary growth phase was observed by TEM. The images showed increasing number of cells exhibiting reduced intracellular complexity presumably due to loss of membrane integrity in the presence of 10 and 20% of NHS, compared to the control (**Figure 4**).

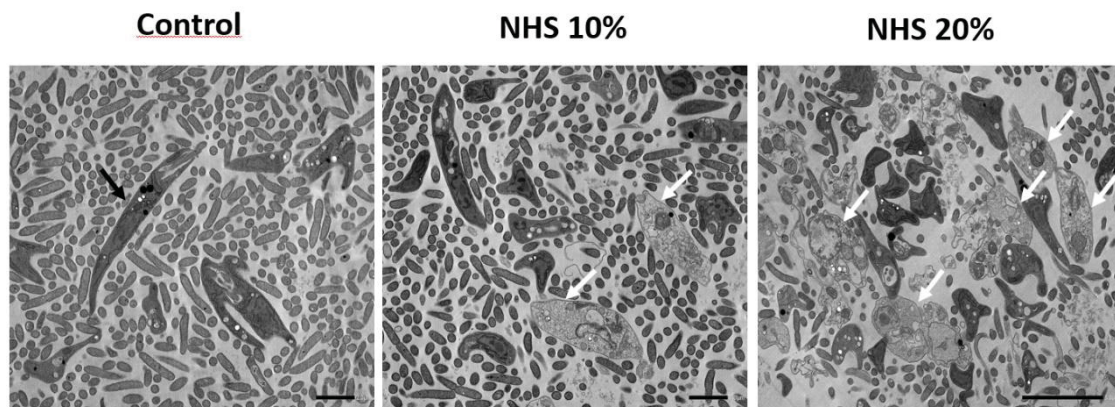


Figure 4: TEM of lytic effect of complement on promastigotes of *L. infantum*. Parasites were incubated with 0, 10 or 20% NHS at 37°C, prepared to transmission electron microscopy and evaluated at 100 kV with a JEOL JEM-1400 PLUS. Intact promastigote=black arrow; damaged promastigote=white arrow.

Taken together, our results corroborate the concept that lectin pathway triggers recognize PAMPS on *L. infantum* promastigotes and that activation of complement maybe followed by lysis of the parasite. However, complement inhibitors have been observed in the saliva [8] and in the intestinal lumen of *Lu. longipalpis* that can inhibit the classical and lectin pathways, soon after the activation of C4 takes place in the invertebrate host [28]. *L. chagasi* promastigotes were shown also to be susceptible to human complement killing during the logarithmic growth phase, but increasingly complement resistant upon transition to the stationary culture phase [9]. This shows the importance to circumvent the complement activation during blood feeding of sandflies for the establishment of infection and that in this case complement receptor-mediated phagocytosis could be a strategy to avoid the complement-mediated lysis.

Our study has some limitations. Although we have shown that collectins (MBL and CL-11) and ficolins (-1 and -3) deposited on the surface of *L. infantum*, the specific targets for these proteins remain to be elucidated. The role of the lectin pathway proteins in the phagocytosis of the parasites is still a matter to be investigated and may indicate a route for the *L. infantum* entry into vertebrate host cells.

In summary, our results show that MBL, CL-11, ficolin-1 and ficolin-3 recognize PAMPs on the surface of live *L. infantum* promastigotes and may lead

to the activation the lectin pathway of complement. The results highlight the importance of collectins and ficolins in the initial immune response to *L. infantum*.

Acknowledgments

We would like to thanks the CTAF (Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência), CAPES (Edital Pró-equipamentos), FINEP (Edital Pró-Infra 2009 [CT-INFRA]). We also thank FIOCRUZ Network of Technological Platforms for access to the Flow Cytometry facility at Carlos Chagas Institute, FIOCRUZ-PR, Fundação Araucária [PPSUS-01/2016] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Lorena Bavia was a recipient of a Pós-doutorado Júnior fellowship from CNPq [420553/2017-7] also Fabiano Borges Figueiredo and Iara J. M. Reason hold grants from CNPq for productivity in research.

References

1. Burza, S., S.L. Croft, and M. Boelaert, *Leishmaniasis*. Lancet, 2018. **392**(10151): p. 951-970.
2. Killick-Kendrick, R., *The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host*. Ann Parasitol Hum Comp, 1990. **65 Suppl 1**: p. 37-42.
3. Moreno, I., et al., *Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of Leishmania infantum promastigotes derived from axenic culture or from Phlebotomus perniciosus*. Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1574-80.
4. Garred, P., et al., *A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond*. Immunol Rev, 2016. **274**(1): p. 74-97.
5. Laurenti, M.D., et al., *The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with Leishmania (Leishmania) chagasi*. Int J Exp Pathol, 1996. **77**(1): p. 15-24.
6. Ambrosio, A.R. and I.J. De Messias-Reason, *Leishmania (Viannia) braziliensis: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism*. Parasite Immunol, 2005. **27**(9): p. 333-40.
7. Domínguez, M., et al., *Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum*. J Exp Med, 2002. **195**(4): p. 451-9.
8. Mendes-Sousa, A.F., et al., *Different host complement systems and their interactions with saliva from Lutzomyia longipalpis (Diptera, Psychodidae) and Leishmania infantum promastigotes*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79787.
9. Ramer-Tait, A.E., et al., *Differential surface deposition of complement proteins on logarithmic and stationary phase Leishmania chagasi promastigotes*. J Parasitol, 2012. **98**(6): p. 1109-16.

10. Santos, I.K., et al., *Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis*. Infect Immun, 2001. **69**(8): p. 5212-5.
11. Alonso, D.P., et al., *Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications*. J Infect Dis, 2007. **195**(8): p. 1212-7.
12. Asgharzadeh, M., et al., *Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum*. Pak J Biol Sci, 2007. **10**(11): p. 1850-4.
13. Hamdi, S., et al., *A variant in the promoter of MBL2 is associated with protection against visceral leishmaniasis in Morocco*. Infect Genet Evol, 2013. **13**: p. 162-7.
14. Mishra, A., et al., *Association of Ficolin-2 Serum Levels and FCN2 Genetic Variants with Indian Visceral Leishmaniasis*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125940.
15. McConville, M.J. and M.A. Ferguson, *The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes*. Biochem J, 1993. **294** (Pt 2): p. 305-24.
16. Forestier, C.L., Q. Gao, and G.J. Boons, *Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?* Front Cell Infect Microbiol, 2014. **4**: p. 193.
17. de Assis, R.R., et al., *Glycoconjugates in New World species of Leishmania: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(9): p. 1354-65.
18. Soares, R.P., et al., *Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis*. Int J Parasitol, 2005. **35**(3): p. 245-53.
19. Soares, R.P., et al., *Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis*. Mol Biochem Parasitol, 2002. **121**(2): p. 213-24.
20. Assis, R.R., et al., *Glycoinositolphospholipids from Leishmania braziliensis and L. infantum: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(2): p. e1543.
21. Endo, Y., M. Matsushita, and T. Fujita, *New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity*. Int Rev Cell Mol Biol, 2015. **316**: p. 49-110.
22. Matsushita, M., et al., *A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin*. J Biol Chem, 1996. **271**(5): p. 2448-54.
23. Le, Y., et al., *Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain*. FEBS Lett, 1998. **425**(2): p. 367-70.
24. Mosser, D.M. and P.J. Edelson, *The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of Leishmania major*. Nature, 1987. **327**(6120): p. 329-31.
25. Da Silva, R.P., et al., *CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective Leishmania major metacyclic promastigotes to human macrophages*. J Immunol, 1989. **143**(2): p. 617-22.

26. Wilson, M.E. and R.D. Pearson, *Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes*. Infect Immun, 1988. **56**(2): p. 363-9.
27. Ambrosio, A.R., et al., *Novel findings on the role of ficolins and colectins in the innate response against Leishmania braziliensis*. Acta Trop, 2020. **212**: p. 105673.
28. Saab, N.A.A., et al., *How Lutzomyia longipalpis deals with the complement system present in the ingested blood: The role of soluble inhibitors and the adsorption of factor H by midgut*. J Insect Physiol, 2020. **120**: p. 103992.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez que as proteínas ativadoras da via das lectinas (Ficolina-1, Ficolina-2, Ficolina-3 e CL-11), interagem com as formas promastigotas infectivas da *L. braziliensis*. Além disso, observamos que as proteínas apresentam diferenças na intensidade de ligação com o parasito. A interação dessas proteínas com glicoconjugados da superfície da *L. braziliensis* foi demonstrada pela participação do carboidrato acetilado N-acetil-D-glucosamina nessa ligação. Nosso grupo já havia demonstrado a deposição de MBL e C4 na superfície de formas promastigotas da *L. braziliensis* após interação com o soro humano normal (AMBROSIO; DE MESSIAS-REASON, 2005). Neste estudo, evidenciamos que as ficolinas e a CL-11 também participam neste processo, sugerindo que a *L. braziliensis* conduz a uma ativação preferencial da via das lectinas pelas ficolinas, sinalizando a participação da via das lectinas nos primeiros passos da infecção.

Nosso trabalho também demonstrou, pela primeira vez a ligação da Ficolina-1, Ficolina-3 e CL-11 e não da Ficolina-2 a superfície de formas promastigotas da *L. infantum*. Comparativamente, caracterizamos que a MBL e Ficolina-1 apresentaram maior intensidade de ligação, seguida pela Ficolina-3 e finalmente pela CL-11. Este estudo também evidenciou que a interação do soro humano normal com as formas promastigotas da *L. infantum* conduz a deposição de C3 e C4, indicando tanto que a via das lectinas como clássica e alternativa podem ser ativadas pelo parasito.

Considerando que *L. braziliensis* e *L. infantum* são patógenos intracelulares e a fagocitose é essencial para o estabelecimento da infecção, ficolinas, MBL e CL-11 ligando-se aos promastigotas poderiam fornecer um mecanismo adicional de entrada dos parasitos nas células fagocíticas,

especialmente ficolina-1 que é expressa na membrana da célula fagocítica (HONORÉ; RØRVIG; HUMMELSHØJ; SKJOEDT *et al.*, 2010). Similarmente à ficolina-1, a ficolina-3 também se liga aos parasitos e diferentemente da ficolina-1 que é expressa em células fagocíticas e encontrada solúvel no plasma, a ficolina-3 está presente apenas no plasma. Considerando que granulócitos e macrófagos são as primeiras células do tecido a encontrar a *L. braziliensis* e a *L. infantum* após a picada do flebotomíneo e que a ficolina-1 é expressa na superfície dessas células, a ficolina-1 embora esteja presente em baixos níveis no soro (cerca de 0,3 µg / ml) (LIU; ENDO; IWAKI; NAKATA *et al.*, 2005), pode ser importante no estágio inicial dessa infecção. Outra possibilidade que pode ser considerada é um sinergismo de todos os PRMs, nas primeiras etapas de defesa do hospedeiro após a inoculação dos promastigotas. No entanto, também tem sido observada a presença de inibidores do complemento na saliva de *Lu. longipalpis* que podem participar da proteção dos promastigotas, no local da picada (MENDES-SOUSA; NASCIMENTO; QUEIROZ; VALE *et al.*, 2013). Portanto, o resultado dessa interação ajudará a determinar o destino da infecção.

Finalmente, nossos achados indicam a necessidade de continuidade dos estudos em pacientes portadores das leishmanioses, para melhor esclarecimento dos mecanismos de infecção e evidenciar a importância do complemento no desfecho clínico ou gravidade da doença.

6. CONCLUSÕES

As proteínas do sistema complemento MBL, CL-11, ficolina-1, ficolina-2 e ficolina-3 se ligam a superfície das formas promastigotas da *L. braziliensis* e *L. infantum*.

Ficolina-1 e ficolina-3 demonstraram maior afinidade de ligação pela *L. braziliensis*, enquanto a MBL e a Ficolina-1 demonstraram maior afinidade a promastigotas da *L. infantum*.

O carboidrato N-Acetil-D-glucosamina participa da interação entre ficolina-1, ficolina-2, ficolina-3 e CL-11 e os promastigotas da *L. braziliensis*.

A proteína do complemento ficolina-2 não possui capacidade de ligação a promastigotas da *L. infantum*.

A interação do SHN com promastigotas da *L. infantum* conduz a deposição de C3 e C4 na sua superfície.

7 DE MAIS PRODUÇÕES

7.1 ARTIGO – 3

Publicado no periódico *Frontiers in Microbiology* (Qualis A1/Fator de impacto 4.235), revisão com primeira autoria compartilhada, 2017.



REVIEW
published: 20 April 2017
doi: 10.3389/fmicb.2017.00607



The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*

Kárita C. F. Lidani^{†*}, Lorena Bavia[†], Altair R. Ambrosio[†] and Iara J. de Messias-Reason^{*}

Laboratory of Molecular Immunopathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Angela Silva Barbosa,
Instituto Butantan, Brazil

Reviewed by:

Wlmar Dias Da Silva,
Instituto Butantan, Brazil
Marisa Mariel Fernandez,
Instituto de Estudios de la Inmunidad
Humoral (CONICET-UBA), Argentina

*Correspondence:

Kárita C. F. Lidani
karlidani@gmail.com
Iara J. de Messias-Reason
iara.reason@huc.ufpr.br

[†] These authors have contributed
equally to this work.

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Immunology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 10 February 2017

Accepted: 24 March 2017

Published: 20 April 2017

Citation:

Lidani KCF, Bavia L, Ambrosio AR
and de Messias-Reason IJ (2017)
The Complement System: A Prey
of *Trypanosoma cruzi*.
Front. Microbiol. 8:607.
doi: 10.3389/fmicb.2017.00607

Trypanosoma cruzi is a protozoan parasite known to cause Chagas disease (CD), a neglected sickness that affects around 6–8 million people worldwide. Originally, CD was mainly found in Latin America but more recently, it has been spread to countries in North America, Asia, and Europe due the international migration from endemic areas. Thus, at present CD represents an important concern of global public health. Most of individuals that are infected by *T. cruzi* may remain in asymptomatic form all lifelong, but up to 40% of them will develop cardiomyopathy, digestive mega syndromes, or both. The interaction between the *T. cruzi* infective forms and host-related immune factors represents a key point for a better understanding of the physiopathology of CD. In this context, the complement, as one of the first line of host defense against infection was shown to play an important role in recognizing *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes and in controlling parasite invasion. The complement consists of at least 35 or more plasma proteins and cell surface receptors/regulators, which can be activated by three pathways: classical (CP), lectin (LP), and alternative (AP). The CP and LP are mainly initiated by immune complexes or pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), respectively, whereas AP is spontaneously activated by hydrolysis of C3. Once activated, several relevant complement functions are generated which include opsonization and phagocytosis of particles or microorganisms and cell lysis. An important step during *T. cruzi* infection is when intracellular trypomastigotes are release to bloodstream where they may be target by complement. Nevertheless, the parasite uses a sequence of events in order to escape from complement-mediated lysis. In fact, several *T. cruzi* molecules are known to interfere in the initiation of all three pathways and in the assembly of C3 convertase, a key step in the activation of complement. Moreover, *T. cruzi* promotes secretion of plasma membrane-derived vesicles from host cells, which prevent the activity of C3 convertase C4b2a and thereby may hinder complement. In this review, we aim to present an overview on the strategies used by *T. cruzi* in order to circumvent the activation of complement and, consequently, its biological effects.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, complement system, complement regulatory proteins, evasion mechanism, innate immunity

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a hemoflagellate parasite of the order Kinetoplastida and Trypanosomatidae family (Levine et al., 1980) that causes CD. The parasite presents complex mechanisms of surveillance in the mammalian host and exerts direct influence on the course of CD (Watanabe Costa et al., 2016). CD is responsible for more expressive morbimortality than any other parasitic

7.2 ARTIGO - 4

Publicado no periódico *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (Qualis A1/Fator de impacto 5.605), coautor com participação na avaliação imunológica laboratorial, 2020.

Bone Histomorphometry in Young Patients With Type 2 Diabetes is Affected by Disease Control and Chronic Complications

Vicente F. C. Andrade,¹ Domingos C. Chula,² Fábio P. Sabbag,³ Daniel D. da S. Cavalheiro,⁴ Lorena Bavia,⁵ Altair Rogério Ambrósio,⁵ Cleber Rafael V. da Costa,⁶ Luciene M. dos Reis,⁷ Victória Z. C. Borba,¹ and Carolina Aguiar Moreira^{1,6}

¹Endocrine Division (SEMPR), Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ²Nephrology Unit, Clinics Hospital of Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ³Ophthalmologist, retinal and vitreo specialist at the Clinic Center of Vision, Medical School of Ribeirão Preto, São Paulo University, Curitiba, São Paulo, Brazil; ⁴Radiology Clinic, Advanced Diagnostic Imaging (DAPI), Curitiba, Brazil; ⁵Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Medical Pathology, Clinics Hospital of Federal do Paraná University, Brazil; ⁶Laboratory PRO, Section of bone histomorphometry, Fundação Pró-Renal, Curitiba, Brazil; and ⁷LIM 16 – Laboratory of Renal Physiopathology, Clinics Hospital (HCFMUSP), School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

ORCID number: 0000-0001-6101-4359 (Vicente F. C. Andrade).

Context: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is associated with an increased risk of fractures. No study has evaluated the correlation of bone histomorphometry (BH) parameters with glycemic control and presence of chronic complications (CCs) in premenopausal women with T2DM.

Objectives: To evaluate BH and correlate them with the degree of glycemic control and presence of CCs.

Design, settings, and patients: This was a cross-sectional study conducted at a tertiary medical center. Twenty-six premenopausal women with T2DM were divided into groups with glycated hemoglobin HbA1c < 7% (good control, GC; n = 10) and HbA1c > 7% (poor control, PC; n = 16), and further subdivided into groups with (n = 9) and without (n = 17) CCs. BH parameters (bone volume [bone volume per total volume, BV/TV], trabecular thickness [Tb.Th], trabecular number [Tb.N], trabecular separation [Tb.Sp], osteoid thickness [O.Th], osteoid surface [osteoid surface per bone surface, OS/BS]), mineralizing surface [MS/BS], bone formation rate [BFR]), mineral apposition rate [MAR]) as well as serum pentosidine (PEN) and insulin-like growth factor (IGF)-1 were measured. The BH data were compared among the groups and with a BH control group (control group, CG, n = 15) matched by age, sex, and race.

Results: BV/TV was increased in GC ($P < .001$) and PC ($P = .05$) groups and O.th ($P = .03$) was smaller in the PC group than in the CG. A comparison of the groups with and without CCs with the CG showed in the group with CCs, O.Th was smaller ($P = .01$) and BV/TV similar to the CG ($P = .11$). HbA1c correlated negatively with O.Th ($P = .02$) and OS/BS ($P = .01$). There was no correlation of BH to PEN and IGF-1.

Conclusion: BH in premenopausal patients with T2DM is affected by disease control and chronic complications. (*J Clin Endocrinol Metab* 105: 506–514, 2020)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in USA

© Endocrine Society 2019. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Received 21 May 2019. Accepted 3 October 2019.
First Published Online 6 October 2019.

Abbreviations: AGE, advanced glycosylation end-product; BH, bone histomorphometry; BFR, bone formation rate; BMD, bone mineral density; BMI, body mass index; BV/TV, bone volume; CC, chronic complication; CG, control group; ESC, serum sclerostin; IGF, insulin-like growth factor; MAR, mineral apposition rate; MS, mineralizing surface; OS/BS, osteoid surface; O.Th, osteoid thickness; PEN, pentosidine; RV, reference value; T2DM, type 2 diabetes mellitus; Tb.N, trabecular number; Tb.Sp, trabecular separation; Tb.Th, trabecular thickness

7.3 ARTIGO - 5

Publicado no periódico *Journal of Microbiological Methods* (Qualis A3/Fator de impacto 1.707), coautor atuando na extração de DNA microbiano do sangue periférico, 2017.



Comparison of DNA extraction methods used to detect bacterial and yeast DNA from spiked whole blood by real-time PCR



Libera M. Dalla-Costa^{a,c,d,1}, Luis G. Morello^{a,b,1}, Danieli Conte^a, Luciane A. Pereira^a, Jussara K. Palmeiro^{a,c}, Altair Ambrosio^{a,c}, Dayane Cardozo^a, Marco A. Krieger^{a,b}, Sonia M. Raboni^{a,c,*}

^a Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Professor Alcacyr Munhoz Mader, 3775, - 81925-610, Curitiba, Brazil

^b Laboratory of Functional Genomics, Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Professor Alcacyr Munhoz Mader, 3775, - 81310-020, Curitiba, Brazil

^c Laboratory of Bacteriology, Universidade Federal do Paraná, Rua Padre Camargo, 280, - 80060-240, Curitiba, Brazil

^d Faculdade e Instituto de Pesquisa Pê Pequeno Príncipe, Av. Silva Jardim, 1632, - 80250-200, Curitiba, Brazil

^{*} Infectious Disease Division, Universidade Federal do Paraná, Rua Gen. Carneiro, 181, - 80060-900, Curitiba, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Bloodstream infection
Real-time PCR
Staphylococcus aureus
Escherichia coli
Candida albicans

ABSTRACT

Sepsis is the leading cause of death in intensive care units (ICUs) worldwide and its diagnosis remains a challenge. Blood culturing is the gold standard technique for blood stream infection (BSI) identification. Molecular tests to detect pathogens in whole blood enable early use of antimicrobials and affect clinical outcomes. Here, using real-time PCR, we evaluated DNA extraction using seven manual and three automated commercially available systems with whole blood samples artificially contaminated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*, microorganisms commonly associated with BSI. Overall, the commercial kits evaluated presented several technical limitations including long turnaround time and low DNA yield and purity. The performance of the kits was comparable for detection of high microorganism loads (10^6 CFU/mL). However, the detection of lower concentrations was variable, despite the addition of pre-processing treatment to kits without such steps. Of the evaluated kits, the UMD-Universal CE IVD kit generated a higher quantity of DNA with greater nucleic acid purity and afforded the detection of the lowest microbial load in the samples. The inclusion of pre-processing steps with the kit seems to be critical for the detection of microorganism DNA directly from whole blood. In conclusion, future application of molecular techniques will require overcoming major challenges such as the detection of low levels of microorganism nucleic acids amidst the large quantity of human DNA present in samples or differences in the cellular structures of etiological agents that can also prevent high-quality DNA yields.

1. Introduction

Sepsis is the leading cause of death in intensive care units (ICUs). According to the Latin American Sepsis Institute (ILAS), in Brazil, sepsis is responsible for approximately 13% of ICU admissions and the mortality rate due to severe sepsis and septic shock is 30.8% and 64.3%, respectively (Sales Júnior et al., 2006; ILAS, 2015). The prevalence of microorganisms involved in sepsis varies with the epidemiology of each region. According to a surveillance and control of pathogens in Brazilian hospitals study (Brazilian SCOPE Study Group), the most frequently isolated etiologic agents causing blood stream infections (BSI) are *Staphylococcus aureus*, coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. In

children, the top five microorganisms vary slightly: CoNS, *Klebsiella* spp., *S. aureus*, *Acinetobacter* spp., and *Candida albicans*. These groups of microorganisms are responsible for > 60% of BSI in hospitalized patients, whether children or adults (Gales et al., 2009; Marra et al., 2011; Pereira et al., 2013).

Conventional blood culturing is the gold standard technique for BSI diagnosis. The advantages of this method are its simplicity and relatively low cost; however, it can take 1 to 3 days for positive results and up to 5 days for negative results. Moreover, the sensitivity of blood culturing is markedly reduced when the volume of blood inoculated into each blood culture vial is lower than the recommended amount, especially for low abundance microorganisms. Sensitivity of detection is also affected in patients who have undergone previous antimicrobial

* Corresponding author at: Serviço de Infectologia, - Universidade Federal do Paraná, R General Carneiro, 180, 3º andar, CEP: 80060-900, Curitiba, - PR, Brazil.
E-mail addresses: maren.krieger@focuz.br (M.A. Krieger), sraboni@ufpr.br (S.M. Raboni).

¹ These authors should be regarded as joint first authors.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmicmeth.2017.06.020>

Received 9 April 2017; Received in revised form 27 June 2017; Accepted 29 June 2017

Available online 29 June 2017

0167-7012/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

REFERÊNCIAS

ALI, Y. M.; LYNCH, N. J.; HALEEM, K. S.; FUJITA, T. *et al.* The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. **PLoS Pathog**, 8, n. 7, p. e1002793, 2012.

ALONSO, D. P.; FERREIRA, A. F.; RIBOLLA, P. E.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. *et al.* Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. **J Infect Dis**, 195, n. 8, p. 1212-1217, Apr 2007.

AMBROSIO, A. R.; BAVIA, L.; BORGES, B. S.; HIRAIWA, P. M. *et al.* Novel findings on the role of ficolins and colectins in the innate response against *Leishmania braziliensis*. **Acta Trop**, 212, p. 105673, Aug 2020.

AMBROSIO, A. R.; DE MESSIAS-REASON, I. J. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: interaction of mannose-binding lectin with surface glycoconjugates and complement activation. An antibody-independent defence mechanism. **Parasite Immunol**, 27, n. 9, p. 333-340, Sep 2005.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, 35, n. 7, p. 699-705, Oct 2010.

ASGHARZADEH, M.; MAZLOUMI, A.; KAFIL, H. S.; GHAZANCHAEI, A. Mannose-binding lectin gene and promoter polymorphism in visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Pak J Biol Sci**, 10, n. 11, p. 1850-1854, Jun 2007.

ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NORONHA, F. S.; TURCO, S. J. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 2, p. e1543, 2012.

AVILA, J. L.; ROJAS, M.; ACOSTA, A. Glycoinositol phospholipids from American *Leishmania* and *Trypanosoma* spp: partial characterization of the glycan cores and the human humoral immune response to them. **J Clin Microbiol**, 29, n. 10, p. 2305-2312, Oct 1991.

BELTRAME, M. H.; CATARINO, S. J.; GOELDNER, I.; BOLDT, A. B. *et al.* The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease. **Front Pediatr**, 2, p. 148, 2014.

BLOM, A. M.; VILLOUTREIX, B. O.; DAHLBÄCK, B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system? **Mol Immunol**, 40, n. 18, p. 1333-1346, Apr 2004.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol Today**, 15, n. 1, p. 22-28, Jan 1999.

BOHLSON, S. S.; FRASER, D. A.; TENNER, A. J. Complement proteins C1q and MBL are pattern recognition molecules that signal immediate and long-term protective immune functions. **Mol Immunol**, 44, n. 1-3, p. 33-43, Jan 2007.

BOWDRE, J. H.; CAMPBELL, J. L.; WALKER, D. H.; TART, D. E. American mucocutaneous leishmaniasis. Culture of a *Leishmania* species from peripheral blood leukocytes. **Am J Clin Pathol**, 75, n. 3, p. 435-438, Mar 1981.

BRITTINGHAM, A.; MOSSER, D. M. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. **Parasitol Today**, 12, n. 11, p. 444-447, Nov 1996.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **Lancet**, 392, n. 10151, p. 951-970, 09 2018.

CHEN, M.; DAHA, M. R.; KALLENBERG, C. G. The complement system in systemic autoimmune disease. **J Autoimmun**, 34, n. 3, p. J276-286, May 2010.

COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; DA-CRUZ, A. M.; DE LUCA, P. M. *et al.* T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania* *pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania* *braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. **Exp Parasitol**, 84, n. 2, p. 144-155, Nov 1996.

DA SILVA, R. P.; HALL, B. F.; JOINER, K. A.; SACKS, D. L. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. **J Immunol**, 143, n. 2, p. 617-622, Jul 1989.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Front Public Health**, 2, p. 165, 2014.

DAHLIN-LABORDE, R. R.; SCOLARO, E. J.; ROMINE, N. M.; RAMER-TAIT, A. E. *et al.* Characterization of DNA sequences that confer complement resistance in *Leishmania* *chagasi*. **Ann N Y Acad Sci**, 1149, p. 347-351, Dec 2008.

DAHLIN-LABORDE, R. R.; YU, T. P.; BEETHAM, J. K. Genetic complementation to identify DNA elements that influence complement resistance in *Leishmania* *chagasi*. **J Parasitol**, 91, n. 5, p. 1058-1063, Oct 2005.

DE ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; SOARES, R. P. *et al.* Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim Biophys Acta**, 1820, n. 9, p. 1354-1365, Sep 2012.

DEGN, S. E.; JENSENIUS, J. C.; BJERRE, M. The lectin pathway and its implications in coagulation, infections and auto-immunity. **Curr Opin Organ Transplant**, 16, n. 1, p. 21-27, Feb 2011.

DERMINE, J. F.; SCIANIMANICO, S.; PRIVÉ, C.; DESCOTEAUX, A. *et al.* Leishmania promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cell Microbiol**, 2, n. 2, p. 115-126, Apr 2000.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in Leishmania infectivity. **Biochim Biophys Acta**, 1455, n. 2-3, p. 341-352, Oct 1999.

DOMÍNGUEZ, M.; MORENO, I.; LÓPEZ-TRASCASA, M.; TORAÑO, A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. **J Exp Med**, 195, n. 4, p. 451-459, Feb 2002.

DOMÍNGUEZ, M.; TORAÑO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of Leishmania infection. **J Exp Med**, 189, n. 1, p. 25-35, Jan 1999.

DUNKELBERGER, J. R.; SONG, W. C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. **Cell Res**, 20, n. 1, p. 34-50, Jan 2010.

ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. New insights into the role of ficolins in the lectin pathway of innate immunity. **Int Rev Cell Mol Biol**, 316, p. 49-110, 2015.

FORESTIER, C. L.; GAO, Q.; BOONS, G. J. Leishmania lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Front Cell Infect Microbiol**, 4, p. 193, 2014.

GARRED, P.; GENSTER, N.; PILELY, K.; BAYARRI-OLMOS, R. *et al.* A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. **Immunol Rev**, 274, n. 1, p. 74-97, 11 2016.

GAZZINELLI, R. T.; ROPERT, C.; CAMPOS, M. A. Role of the Toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in host resistance and pathogenesis during infection with protozoan parasites. **Immunol Rev**, 201, p. 9-25, Oct 2004.

GIORGIONE, J. R.; TURCO, S. J.; EPAND, R. M. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from Leishmania donovani. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 21, p. 11634-11639, Oct 1996.

GOUT, E.; GARLATTI, V.; SMITH, D. F.; LACROIX, M. *et al.* Carbohydrate recognition properties of human ficolins: glycan array screening reveals the sialic acid binding specificity of M-ficolin. **J Biol Chem**, 285, n. 9, p. 6612-6622, Feb 2010.

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P. *et al.* Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 106, n. 16, p. 6748-6753, Apr 2009.

HAMDI, S.; EJGHAL, R.; IDRISSE, M.; EZZIKOURI, S. *et al.* A variant in the promoter of MBL2 is associated with protection against visceral leishmaniasis in Morocco. **Infect Genet Evol**, 13, p. 162-167, Jan 2013.

HANSEN, S.; SELMAN, L.; PALANIYAR, N.; ZIEGLER, K. *et al.* Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. **J Immunol**, 185, n. 10, p. 6096-6104, Nov 2010.

HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annu Rev Immunol**, 21, p. 547-578, 2003.

HONORÉ, C.; RØRVIG, S.; HUMMELSHØJ, T.; SKJOEDT, M. O. *et al.* Tethering of Ficolin-1 to cell surfaces through recognition of sialic acid by the fibrinogen-like domain. **J Leukoc Biol**, 88, n. 1, p. 145-158, Jul 2010.

HUMMELSHØJ, T.; FOG, L. M.; MADSEN, H. O.; SIM, R. B. *et al.* Comparative study of the human ficolins reveals unique features of Ficolin-3 (Hakata antigen). **Mol Immunol**, 45, n. 6, p. 1623-1632, Mar 2008.

JENSEN, P. H.; LAURSEN, I.; MATTHIESEN, F.; HØJRUP, P. Posttranslational modifications in human plasma MBL and human recombinant MBL. **Biochim Biophys Acta**, 1774, n. 3, p. 335-344, Mar 2007.

JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin (MBL) pathway of complement activation: biochemistry, biology and clinical implications. **Adv Exp Med Biol**, 564, p. 21-22, 2005.

KASK, L.; VILLOUTREIX, B. O.; STEEN, M.; RAMESH, B. *et al.* Structural stability and heat-induced conformational change of two complement inhibitors: C4b-binding protein and factor H. **Protein Sci**, 13, n. 5, p. 1356-1364, May 2004.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Hum Comp**, 65 Suppl 1, p. 37-42, 1990.

KRARUP, A.; THIEL, S.; HANSEN, A.; FUJITA, T. *et al.* L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. **J Biol Chem**, 279, n. 46, p. 47513-47519, Nov 2004.

LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; SOTTO, M. N.; SINHORINI, I. L. *et al.* The role of complement in the acute inflammatory process in the skin and in host-parasite interaction in hamsters inoculated with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Int J Exp Pathol**, 77, n. 1, p. 15-24, Feb 1996.

LE, Y.; LEE, S. H.; KON, O. L.; LU, J. Human L-ficolin: plasma levels, sugar specificity, and assignment of its lectin activity to the fibrinogen-like (FBG) domain. **FEBS Lett**, 425, n. 2, p. 367-370, Mar 1998.

LINCOLN, L. M.; OZAKI, M.; DONELSON, J. E.; BEETHAM, J. K. Genetic complementation of Leishmania deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. **Mol Biochem Parasitol**, 137, n. 1, p. 185-189, Sep 2004.

LIU, Y.; ENDO, Y.; IWAKI, D.; NAKATA, M. *et al.* Human M-ficolin is a secretory protein that activates the lectin complement pathway. **J Immunol**, 175, n. 5, p. 3150-3156, Sep 2005.

MA, Y. J.; DONI, A.; ROMANI, L.; JÜRGENSEN, H. J. *et al.* Ficolin-1-PTX3 complex formation promotes clearance of altered self-cells and modulates IL-8 production. **J Immunol**, 191, n. 3, p. 1324-1333, Aug 2013.

MATSUSHITA, M.; ENDO, Y.; TAIRA, S.; SATO, Y. *et al.* A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. **J Biol Chem**, 271, n. 5, p. 2448-2454, Feb 1996.

MCCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem J**, 294 (Pt 2), p. 305-324, Sep 1993.

MCCONVILLE, M. J.; HOMANS, S. W.; THOMAS-OATES, J. E.; DELL, A. *et al.* Structures of the glycoinositolphospholipids from Leishmania major. A family of novel galactofuranose-containing glycolipids. **J Biol Chem**, 265, n. 13, p. 7385-7394, May 1990.

MENDES-SOUSA, A. F.; NASCIMENTO, A. A.; QUEIROZ, D. C.; VALE, V. F. *et al.* Different host complement systems and their interactions with saliva from Lutzomyia longipalpis (Diptera, Psychodidae) and Leishmania infantum promastigotes. **PLoS One**, 8, n. 11, p. e79787, 2013.

MISHRA, A.; ANTONY, J. S.; SUNDARAVADIVEL, P.; TONG, H. V. *et al.* Association of Ficolin-2 Serum Levels and FCN2 Genetic Variants with Indian Visceral Leishmaniasis. **PLoS One**, 10, n. 5, p. e0125940, 2015.

MORENO, I.; MOLINA, R.; TORAÑO, A.; LAURIN, E. *et al.* Comparative real-time kinetic analysis of human complement killing of Leishmania infantum promastigotes derived from axenic culture or from Phlebotomus perniciosus. **Microbes Infect**, 9, n. 14-15, p. 1574-1580, 2007 Nov-Dec 2007.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of Leishmania major. **Nature**, 327, n. 6120, p. 329-331, 1987 May 28-Jun 3 1987.

MOSSER, D. M.; SPRINGER, T. A.; DIAMOND, M. S. Leishmania promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **J Cell Biol**, 116, n. 2, p. 511-520, Jan 1992.

PEREIRA, R. M.; TEIXEIRA, K. L.; BARRETO-DE-SOUZA, V.; CALEGARI-SILVA, T. C. *et al.* Novel role for the double-stranded RNA-activated protein

kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*. **FASEB J**, 24, n. 2, p. 617-626, Feb 2010.

PESSOA, S. B.; VILLELA, F. [Studies upon the treatment of cutaneous leishmaniasis by eparseno]. **Hospital (Rio J)**, 34, n. 4, p. 527-532, Oct 1948.

PIEDRAFITA, D.; PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; XU, D. *et al.* Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania* phosphoglycans. **Eur J Immunol**, 29, n. 1, p. 235-244, 01 1999.

PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; FENG, G. J.; WEI, W. Q. *et al.* Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 93, n. 20, p. 10984-10989, Oct 1996.

RAMER-TAIT, A. E.; LEI, S. M.; BELLAIRE, B. H.; BEETHAM, J. K. Differential surface deposition of complement proteins on logarithmic and stationary phase *Leishmania chagasi* promastigotes. **J Parasitol**, 98, n. 6, p. 1109-1116, Dec 2012.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 104, n. 7, p. 937-954, Nov 2009.

REN, Y.; DING, Q.; ZHANG, X. Ficolins and infectious diseases. **Virol Sin**, 29, n. 1, p. 25-32, Feb 2014.

RICKLIN, D.; HAJISHENGALLIS, G.; YANG, K.; LAMBRIS, J. D. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. **Nat Immunol**, 11, n. 9, p. 785-797, Sep 2010.

SAAB, N. A. A.; NASCIMENTO, A. A. S.; QUEIROZ, D. C.; DA CUNHA, I. G. M. *et al.* How *Lutzomyia longipalpis* deals with the complement system present in the ingested blood: The role of soluble inhibitors and the adsorption of factor H by midgut. **J Insect Physiol**, 120, p. 103992, Jan 2020.

SANTOS, I. K.; COSTA, C. H.; KRIEGER, H.; FEITOSA, M. F. *et al.* Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, 69, n. 8, p. 5212-5215, Aug 2001.

SAÚDE, M. D. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília-DF: Ministério da Saúde, 2017. 189 p.

SAÚDE, M. D.; SAÚDE, S. D. V. E. **Leishmaniose Visceral**. Brasília DF: Ministério da Saúde, 2017. 120 p.

SELMAN, L.; HANSEN, S. Structure and function of collectin liver 1 (CL-L1) and collectin 11 (CL-11, CL-K1). **Immunobiology**, 217, n. 9, p. 851-863, Sep 2012.

- SOARES, R. P.; CARDOSO, T. L.; BARRON, T.; ARAÚJO, M. S. *et al.* Leishmania braziliensis: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **Int J Parasitol**, 35, n. 3, p. 245-253, Mar 2005.
- SOARES, R. P.; MACEDO, M. E.; ROPERT, C.; GONTIJO, N. F. *et al.* Leishmania chagasi: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector Lutzomyia longipalpis. **Mol Biochem Parasitol**, 121, n. 2, p. 213-224, May 2002.
- STARK, D.; PETT, S.; MARRIOTT, D.; HARKNESS, J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to Leishmania infantum in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. **J Clin Microbiol**, 44, n. 3, p. 1178-1180, Mar 2006.
- SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and. **Open Biol**, 7, n. 9, 09 2017.
- TAKAHASHI, K.; OHTANI, K.; LARVIE, M.; MOYO, P. *et al.* Elevated plasma CL-K1 level is associated with a risk of developing disseminated intravascular coagulation (DIC). **J Thromb Thrombolysis**, 38, n. 3, p. 331-338, Oct 2014.
- TANIO, M.; KONDO, S.; SUGIO, S.; KOHNO, T. Trivalent recognition unit of innate immunity system: crystal structure of trimeric human M-ficolin fibrinogen-like domain. **J Biol Chem**, 282, n. 6, p. 3889-3895, Feb 2007.
- TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. **Annu Rev Microbiol**, 46, p. 65-94, 1992.
- VENKATRAMAN GIRIJA, U.; FURZE, C. M.; GINGRAS, A. R.; YOSHIZAKI, T. *et al.* Molecular basis of sugar recognition by collectin-K1 and the effects of mutations associated with 3MC syndrome. **BMC Biol**, 13, p. 27, Apr 2015.
- WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **N Engl J Med**, 344, n. 14, p. 1058-1066, Apr 2001.
- WALTON, B. C.; CHINEL, L. V.; EGUÍA Y EGUÍA, O. Onset of espundia after many years of occult infection with Leishmania braziliensis. **Am J Trop Med Hyg**, 22, n. 6, p. 696-698, Nov 1973.
- WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. **Infect Immun**, 56, n. 2, p. 363-369, Feb 1988.
- YONEYAMA, K. A.; TANAKA, A. K.; SILVEIRA, T. G.; TAKAHASHI, H. K. *et al.* Characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. **J Lipid Res**, 47, n. 10, p. 2171-2178, Oct 2006.
- YOSHIZAKI, T.; OHTANI, K.; MOTOMURA, W.; JANG, S. J. *et al.* Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. **J Biochem**, 151, n. 1, p. 57-64, Jan 2012.

ZIJLSTRA, E. E.; MUSA, A. M.; KHALIL, E. A.; EL-HASSAN, I. M. *et al.* Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, 3, n. 2, p. 87-98, Feb 2003.